

AUS DER ABTEILUNG FÜR  
KINDER- UND JUGENDMEDIZIN  
PROF. DR. M. MELTER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**BESTEHT EINE ASSOZIATION ZWISCHEN  
FRÜH-POSTOPERATIVER GENEXPRESSION  
DER CHEMOKINE IP10 UND MIG SOWIE  
DEREN REZEPTOR CXCR3 UND DER  
ENTWICKLUNG VON ABSTOßUNGEN NACH  
LEBERTRANSPLANTATION?**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

vorgelegt von  
Norman Junge

2010

**Dekan:**

**Prof. Dr. Bernhard Weber**

**Erster Berichterstatter:**

**Prof. Dr. Michael Melter**

**Zweiter Berichterstatter:**

**Prof. Dr. Bernhard Banas**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**02.11.2010**

|  |           |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis   | 1         |
| <b>1 Einleitung</b>  | <b>3</b>  |
| <b>1.1 Die Lebertransplantation</b>  | <b>3</b>  |
| 1.1.1 Die Entwicklung der Lebertransplantation   | 3         |
| 1.1.2 Aktuelle Zahlen zur Lebertransplantation in Deutschland  | 5         |
| 1.1.3 Operationsverfahren der oLTX   | 6         |
| 1.1.4 Immunsuppression nach Lebertransplantation   | 6         |
| 1.1.5 Probleme der Lebertransplantation  | 8         |
| 1.1.6 Definition der Toleranz nach allogener Organtransplantation  | 11        |
| 1.1.7 Immunologie der Leber und Sonderstellung der Lebertransplantation im Vergleich zu anderen Organtransplantationen | 13        |
| <b>1.2 Chemokine</b>   | <b>16</b> |
| <b>1.3 Zielsetzung der Arbeit</b>  | <b>20</b> |
| <b>2 Material und Methoden</b>   | <b>21</b> |
| <b>2.1 Patientenkollektiv</b>  | <b>21</b> |
| <b>2.2 Probengewinnung</b>   | <b>24</b> |
| <b>2.3 Probenaufbereitung</b>  | <b>24</b> |
| 2.3.1 Aufbereitung durch die Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH)                                    | 24        |
| 2.3.2 Aufschließen, Homogenisieren und Aufbereiten der Proben  | 25        |
| 2.3.3 Photometrische Messung der RNS Ausbeute  | 28        |
| 2.3.4 RT-Prozeß mittels „Two Enzyme Assay“   | 28        |
| 2.3.5 TaqMan Real Time RT- PCR mit ABI- PRISM 7700 SDS   | 31        |
| 2.3.6 Statistik  | 43        |
| <b>3 Ergebnisse</b>  | <b>45</b> |
| <b>3.1 Klinischer Verlauf der Studienpatienten</b>   | <b>45</b> |
| <b>3.2 Relative Genexpression nach delta Ct Methode</b>  | <b>46</b> |
| 3.2.1 Prüfung des Zusammenhangs von Abstoßung und delta Ct Werten mit den Tests nach Mann-Whitney und Kruskal-Wallis   | 52        |
| 3.2.2 Untersuchung der prognostischen Aussagekraft der Genexpression   | 72        |
| 3.2.3 ROC Kurven   | 76        |
| 3.2.4 Zusammenhang von Chemokinexpression und klinischen Parametern  | 83        |
| <b>3.3 Relative Genexpression nach der delta, delta Ct Methode</b>   | <b>84</b> |
| <b>4 Diskussion</b>  | <b>87</b> |
| <b>4.1 Diskussion der Ergebnisse</b>   | <b>87</b> |
| 4.1.1 Verlauf und Plausibilität der Zielgenexpression  | 88        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b>  | <b>2</b>   |
| 4.1.2 Abstoßung  | 90         |
| 4.1.3 Immunsuppression   | 96         |
| 4.1.4 Immunmonitoring  | 97         |
| 4.1.5 Ischiämie-Reperfusionsschaden (IRI)  | 98         |
| 4.1.6 Organbeurteilung   | 101        |
| 4.1.7 Vergleich mit anderen Studien  | 102        |
| 4.1.8 Vergleich mit Transplantationen anderer Organe   | 105        |
| 4.1.9 Delta,Delta Ct Werte   | 106        |
| <b>4.2 Kritische Anmerkungen</b>   | <b>108</b> |
| <b>5 Zusammenfassung</b>   | <b>110</b> |
| <b>6 Literaturverzeichnis</b>  | <b>112</b> |
| <b>7 Anhang</b>  | <b>118</b> |
| 7.1 Abkürzungsverzeichnis  | 118        |
| 7.2 Patienten-Information und Einwilligungserklärung zur Marker – Untersuchung<br>(Chemokin-Studie): | 119        |
| 7.3 Lebenslauf   | 122        |
| 7.4 Erklärung über Selbständigkeit   | 123        |
| 7.5 Erklärung zur Anregung und Überwachung der Dissertation  | 124        |
| <b>8 Danksagung</b>  | <b>125</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Lebertransplantation

### 1.1.1 Die Entwicklung der Lebertransplantation

Die erste orthotope Verstorbenen-Lebertransplantation wurde 1963 von T.E. Starzl an einem dreijährigen Kind in Denver durchgeführt. Der Patient verstarb wenige Stunden nach Transplantation an unstillbaren Blutungen. Daraufhin führten Starzl und andere Chirurgen in den USA, England und Deutschland weitere orthotopische Lebertransplantationen (oLTX) durch. Die 1-Jahres-Überlebensrate betrug zu dieser Zeit lediglich 8,2 %. Die erste Lebertransplantation in Deutschland wurde 1969 von A. Gütgemann an der Universitätsklinik Bonn durchgeführt. 1972 wurde an der Medizinischen Hochschule Hannover von R. Pichelmayr das bedeutendste deutsche oLTX-Programm ins Leben gerufen. 1977 betrug die Zahl der weltweit durchgeführten oLTX schon 300 und die 1-Jahres-Überlebensrate 30 %. Die Einführung der Calcineurininhibitoren zur Immunsuppression (1978 Cyclosporin A, 1994 Tacrolimus) verbesserte die 1-Jahres-Überlebensrate (JÜR) in kurzer Zeit auf 60-70 %. Durch die Entwicklung von Interleukin-2-Rezeptor-Antagonisten konnte die Rate früher akuter Abstoßungen vermindert werden. Ein weiterer entscheidender Fortschritt konnte durch die Verbesserung der Konservierung während der kalten Ischiämiezeit erreicht werden. Die 1988 entwickelte University of Wisconsin Solution (UW) erlaubt Ischiämiezeiten bis zu 18 Stunden (1,2). Die heute auch oft verwendete Histidine-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK), welche ursprünglich für die Konservierung von Herzen entwickelt wurde, wurde von mehreren Arbeitsgruppen als gleichwertig zur UW Lösung gefunden (3). Die Modifikation der Konservierung mittels arterieller Druck-

perfusion des Spenderorgans mit UW oder HTK Lösung konnte die Organkonservierung weiter verbessern (4).

Heute stellt die Lebertransplantation die Therapie der Wahl für viele akute und chronische Lebererkrankungen im Endstadium dar. Die Prognose hat sich mit 1-JÜR von 90 %, 5-JÜR von 80 % (US Multicenter FK506 Liver Study Group, European FK506 Multicenter Liver Study Group) und einer 5-Jahres-Organ-Überlebensrate von 60 % deutlich verbessert. Die Langzeitprognose der lebertransplantierten Patienten wird heute im Wesentlichen von den Nebenwirkungen der Immunsuppression mitbestimmt.

Aufgrund des Missverhältnisses zwischen Warteliste und vorhandenen Spenderorganen wurde 1989 erstmals eine Teil-Lebertransplantation durchgeführt. Dieses Verfahren macht die Lebendspende in der Lebertransplantation möglich. Es werden den Empfängern, meistens Kindern, entweder der linke Leberlappen (Segment I und II-IV) oder der linkslaterale Leberlappen (Segmente II und III) transplantiert. Die anderen Segmente verbleiben dem Lebendspender oder können bei der Verstorbenspende einem anderen Empfänger transplantiert werden.

### 1.1.2 Aktuelle Zahlen zur Lebertransplantation in Deutschland

Im Jahr 2006 wurden in Deutschland 971 oLTX mit Organen von verstorbenen Organspendern und 83 Lebendspenden durchgeführt. Davon wurden 141 Lebertransplantationen in der medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt (5). Die Indikationen zur Lebertransplantation teilen sich wie in Abb.1 dargestellt auf.

| Deutschland 2006<br>Indikationen für eine Lebertransplantation                                      |             |
|---|-------------|
| Akute oder subakute Hepatitis   | 69          |
| Akutes Leberversagen  | 74          |
| Sekundäre biliäre Zirrhose  | 14          |
| Primäre biliäre Zirrhose  | 52          |
| Sklerosierende Cholangitis  | 68          |
| Gallengangstau  | 2           |
| Gallengangsatresie  | 14          |
| Angeborene Gallenwegserkrankung   | 0           |
| Äthyltoxische Zirrhose  | 289         |
| Autoimmunzirrhose   | 41          |
| Posthepatitische Zirrhose   | 272         |
| Zirrhose, unbekannte Ursache  | 330         |
| Hepatocelluläres Carcinom   | 158         |
| Gallenblasen Carcinom   | 0           |
| Gallengangs Carcinom  | 6           |
| Lebermetastasen   | 11          |
| Andere bösartige Lebererkrankung  | 10          |
| Stoffwechselerkrankung  | 47          |
| Budd-Chiari-Syndrom   | 16          |
| Polyzystische Lebererkrankung   | 18          |
| Gutartiger Lebertumor   | 11          |
| Andere Lebererkrankung  | 134         |
|   | <b>1636</b> |
| Diese Darstellung entspricht der Systematik von ELTR (European Liver Transplant Registry) 98 DSO 07 |             |

Abb. 1: Indikationen zur Lebertransplantation 2006; Quelle [www.dso.de](http://www.dso.de)

### 1.1.3 Operationsverfahren der oLTX

Bei Explantation der Leber wird diese mittels Druckperfusion über die Aorta sowie simultan ohne Druck über die Pfortader mit UW oder HTK Lösung perfundiert. Die Präparation der Leber erfolgt „backtable“ und umfasst die Darstellung der A.hepatica und des Truncus coeliacus mit Ligatur und Übernahme von Gefäßabgängen. Im Bereich der Vena Cava werden Venenzuflüsse übernäht oder ligiert. Des Weiteren wird eine Cholecystektomie durchgeführt falls diese noch nicht bei der Explantation erfolgt ist. Zeitgleich kann mit der Empfänger-Hepatektomie begonnen werden. Danach wird das Spenderorgan orthotop implantiert. Nach Anastomisierung der Gefäße wird die Leber reperfundiert und geflusht. Es findet hier eine Kontrolle der Anastomosen und eventuelle Korrektur statt. Danach folgt die Anastomose des Gallenganges. Hier gibt es je nach Grunderkrankung und anatomischen Gegebenheiten verschiedene Methoden zum Beispiel eine Seit-zu-Seit oder End-zu-End Choledocho-Choledochostomie, eine End-zu-End Hepatico-choledochostomie mit Einlage einer T-Drainage oder eine End-zu-Seit-Hepatikojejunostomie nach Roux Y.

### 1.1.4 Immunsuppression nach Lebertransplantation

Die immunsuppressive Therapie nach Lebertransplantation hat im Verlauf der letzten Jahre eine bedeutende Weiterentwicklung erfahren. Das Standardregime der immunsuppressiven Therapie in der MHH nach oLTX umfasst eine Dreifachtherapie aus einem IL2 Rezeptorantagonisten (z.B. Basiliximab), einem Calcineurininhibitor und Prednisolon, welches oft im Verlauf ausgeschlichen wird.



Die Calcineurininhibitoren Cyclosporin und Tacrolimus sind weiterhin die Grundpfeiler der immunsuppressiven Therapie. Sie können jedoch je nach Grunderkrankung und Ausprägung der Nebenwirkungen durch neuere Medikamente ergänzt oder ersetzt werden.

Die Calcineurininhibitoren hemmen die Bildung von IL2. Problematisch sind ihre geringe therapeutische Breite und die sehr variable Pharmakokinetik. Die Therapie wird deshalb durch Spiegelbestimmungen kontrolliert. Die wichtigsten Nebenwirkungen sind die Nephrotoxizität, die Neurotoxizität und das Entstehen von Lymphomen.

Sirolimus ist ein neueres Immunsuppressivum, welches die T-Zell Aktivierung auf verschiedenen Ebenen hemmt. Es kann ergänzend eingesetzt werden, oder bei progredientem Nierenversagen auch alternativ als Monotherapie angewandt werden. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass es Tumorwachstum (6) und Angiogenese (7) hemmt und damit besonders indiziert für Patienten mit oLTX nach Hepatocellulärem Carcinom ist. Die wichtigste Nebenwirkung ist eine verminderte Wundheilung.

Mycophenolat Mofetil (MMF) hemmt selektiv die Lymphozytenproliferation und kann z.B. im Rahmen einer Dreifachtherapie angewandt werden. Es bietet möglicherweise einen Vorteil bei Patienten mit oLTX nach Hepatitis C (8).

IL2 Rezeptor Antikörper wie zum Beispiel Basiliximab stellen eine wichtige Bereicherung für die LTX dar, da sie effektiv die frühe akute Abstoßung verhindern können. Basiliximab zum Beispiel wird einmal am Tag der Transplantation und einmal 4 Tage danach gegeben.

### 1.1.5 Probleme der Lebertransplantation

Bei der Therapie von Patienten mittels Lebertransplantation ergeben sich folgende sechs Probleme.

#### 1.1.5.1 Angebot und Nachfrage

Die ständige Erweiterung der Indikationen für eine oLTX führen vermehrt zu einem Missverhältnis von Angebot und Nachfrage.

#### 1.1.5.2 Beurteilung der Güte eines Organs

Das Missverhältnis von Angebot und Nachfrage führt dazu, dass die Kriterien zur Auswahl eines Organs weicher werden, was die Gefahr von initialem Transplantversagen erhöht. Somit ist es von großer Bedeutung die Qualität eines Organs vor der Transplantation adäquat beurteilen zu können. Bisher gibt es hierfür keinen objektiven singulären Marker.

#### 1.1.5.3 Initiales Transplantversagen

Dieses Problem beruht auf einer heterogenen Gruppe von pathophysiologischen Zusammenhängen. Es ist der Hauptgrund für frühe Retransplantationen. Die Häufigkeit des Organ- oder Lebensverlustes durch initiales Transplantversagen sind dank verbesserter OP-Techniken und besserem perioperativen Management geringer geworden.

#### 1.1.5.4 Abstoßungen

Bei einer Abstoßung kommt es zur Zerstörung oder Schädigung des transplantierten Organs durch das allogene Empfänger-Immunsystem. Dies kann sich in Form von Organdysfunktion bis hin zum Organverlust auswirken. Man unterteilt die Abstoßung bei

allen Organtransplantationen in drei Formen, die hyperakute, die akute und die chronische.

#### 1.1.5.4.1 Hyperakute Abstoßung

Die hyperakute Abstoßung wird durch präformierte Antikörper vermittelt und tritt unmittelbar nach der Transplantation auf.

#### 1.1.5.4.2 Akute Abstoßung

Die akute Abstoßung nach der oLTX ist durch die heutigen immunsuppressiven Therapien von geringerer Bedeutung und hat nach oLTX eine geringere Assoziation zum klinischen Verlauf als bei anderen Organtransplantationen. Die akute Abstoßung ist in der Praxis nicht immer eindeutig zu definieren und schwer von anderen pathologischen Prozessen nach Transplantation, wie zum Beispiel Infektionen, initialem Transplantversagen oder Reperfusionsschäden abzugrenzen. Die Abstoßung wird nach klinischen Aspekten, biochemischen Markern und speziellen histologischen Merkmalen definiert. Es gibt jedoch keinen einzelnen aussagekräftigen biochemischen Marker der den Schweregrad einer Abstoßung wiedergibt oder diese beweist (9). Die akute Abstoßung ist histologisch gekennzeichnet durch mononukleäre Zellen, die die Leber, ähnlich wie bei einer Hepatitis, infiltrieren. Für die histologische Identifikation und Einteilung der akuten Abstoßung werden verschiedene pathologische Scores angewandt. Eine Abstoßung kann histologisch in gering, leicht, mäßig und schwer eingeteilt werden, wobei man bei der geringen Form monozytäre Infiltrate in wenigen Portalfeldern findet und bei der leichten Form in einigen, aber nicht allen. Bei der mäßigen Form findet man in den meisten bis allen Portalfeldern inflammatorische Infiltrate mit einem Übertritt in das Leberparenchym. Bei der schweren Form findet man zusätzlich zentrolubuläre Nekrosen und ballonförmige Zellen so-

wie Veränderungen der Gallengänge. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die akute Abstoßung in den ersten 4 Wochen nach Transplantation im Mittel am siebten bis achten Tag erfolgt und dass 65 % aller Lebertransplantierten im ersten Jahr nach Transplantation mindestens eine akute Abstoßung entwickeln (9). Die akute Abstoßung spricht gut auf eine Steroidbolustherapie oder Umstellung der Immunsuppressiva an. Die akute Abstoßung wird weiter in eine frühe und eine späte Form unterteilt. Letztere wird angenommen ab einem Zeitraum von 4 Wochen nach Transplantation und ist bedeutend seltener, hat eine schlechtere Prognose und spricht schlechter auf eine Steroidstoßtherapie an. Bei der akuten Abstoßung, vor allem bei der frühen, ist es oft schwierig den genauen Grad der Abstoßung anhand von klinischen, paraklinischen und histologischen Befunden zu beurteilen. Allen zur Verfügung stehenden Laborwerten fehlt es an Spezifität und Sensivität. Die histologische Beurteilung ist nicht immer eindeutig, da sich zum Beispiel sowohl ein Konservierungsschaden, als auch eine schwere Abstoßung durch perivenu-läre Nekrosen darstellen kann. Des Weiteren zeigten Schlitt und Mitarbeiter (11), dass 40 % aller Patienten, die histologisch eine Abstoßung zeigen, keine klinischen oder paraklinischen Befundveränderungen aufweisen und keine zusätzliche Immunsuppression benötigen. Es stellt sich also die Frage wann es für den klinischen Verlauf eines Patienten wichtig ist, eine akute Abstoßung zu behandeln und wann nicht.

#### 1.1.5.4.3 Chronische Abstoßung

Die dritte Form der Abstoßung ist die chronische Abstoßung, welche durch die Rarefizierung der kleinen Gallenwege gekennzeichnet ist. Die chronische Abstoßung ist durch Modifikation der im-

munsuppressiven Therapie oft nicht beeinflussbar und häufig ein Grund für eine Retransplantation und damit auch heute noch ein wesentliches Problem nach oLTX.

#### 1.1.5.5 Nebenwirkung der immunsuppressiven Therapie

Die Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie sind in der Behandlung von lebertransplantierten Patienten heute ein bedeutendes Problem, welches den klinischen Verlauf und die Lebensqualität der Patienten stark beeinflusst. Hier zeigt sich die zentrale Bedeutung der genauen Ausbalancierung der immunsuppressiven Therapie. Einerseits muss sie effektiv sein und Abstoßungen, die eine Organschädigung bedingen, vermeiden, andererseits muss sie so gering wie möglich gehalten werden, um die Nebenwirkungen möglichst gering zu halten.

#### 1.1.5.6 Rekurrenz der Grunderkrankung

Die Rekurrenz der Grunderkrankung ist entscheidend für die Prognose nach Lebertransplantation, vor allem bei viralen Hepatiden, Alkoholzirrhose und Tumorerkrankungen.

#### 1.1.6 Definition der Toleranz nach allogener Organtransplantation

Die immunologische Toleranz gegen ein transplantiertes Organ wird in verschiedene Stufen eingeteilt. So gibt es die *absolute Transplantations-Toleranz*, welche durch eine Abwesenheit von Transplantorgan-spezifischer-Alloreaktivität in vivo und in vitro ohne Immunsuppression gekennzeichnet ist. Diese Form der Toleranz kann nur durch zentrale Mechanismen im Thymus erfolgen und ist für die klinische Praxis der Organtransplantation irrelevant.

Die *operationale Toleranz* ist definiert durch die Abwesenheit von akuter und chronischer Abstoßung mit normaler Organfunktion und Histologie bei einem Immunkompetenten Patienten ohne immunsuppressive Therapie. Dies ist die Form der Toleranz, welche man bei lebertransplantierten Patienten findet, die ihre immunsuppressive Therapie aufgrund von Infekten, Tumoren, Niereninsuffizienz oder mangelnder Compliance abgesetzt haben. Man kann bei dieser Form der Toleranz durchaus eine Alloreaktivität in vitro feststellen. Am häufigsten findet man diese Form der Toleranz bei pädiatrischen Patienten, bei Lebendspenden und bei Patienten, deren Grunderkrankung keine Autoimmunerkrankung oder virale Hepatitis ist. In diesem Patientenkollektiv kann die operationale Toleranz bei bis zu 20% der Patienten erreicht werden (14).

Die dritte Form der Toleranz ist die *prope Toleranz*. Sie ist definiert durch eine normale Transplantatfunktion und Histologie in der Langzeitbetreuung nach Transplantation bei minimaler immunsuppressiver Therapie, in der Regel einer Monotherapie.

Die Toleranzentwicklung gegenüber dem transplantierten Organ wird bei Lebertransplantation deutlich häufiger beobachtet als bei anderen Organtransplantationen. Die Mechanismen hierfür sind bisher weitestgehend unbekannt. Es gibt einige Mechanismen, von denen man vermutet, dass sie an der Toleranzentwicklung nach oLTX beteiligt sind (siehe Kapitel 1.1.7), doch keiner scheint für sich alleine stehen zu können. Es ist das Zusammenspiel aus verschiedenen immunologischen und anatomischen Besonderheiten der Leber, welches zu der Toleranzentwicklung führt. Es ist bisher nicht gelungen, eine Methode zu etablieren, welche Patienten

selektiert, die eine Toleranz entwickelt haben und deshalb weniger Immunsuppression benötigen würden. Die bisher einzige Methode, die „trial and error“ Methode, stellt hierfür keine adäquate Lösung dar.

#### 1.1.7 Immunologie der Leber und Sonderstellung der Lebertransplantation im Vergleich zu anderen Organtransplantationen

Insbesondere aus immunologischer Sicht nimmt die Leber und Lebertransplantation eine Sonderstellung im Vergleich zu anderen Organen und Organtransplantationen ein. Dies ist begründet in ihrer anatomischen Position, ihrer Zytoarchitektur und ihrer Vielfalt an speziellen Funktionen. Die Leber produziert Akut-Phase-Proteine, phagozytiert Bestandteile des unspezifischen Immunsystems und beseitigt aktivierte T-Zellen einerseits und ist andererseits für die extrathymische Proliferation von neuen T-Zellen des spezifischen Immunsystems verantwortlich (24). Die anatomische Sonderstellung zeigt sich in ihrer Position zwischen dem Verdauungssystem und dem systemischen venösen System, so dass 30% des gesamten Blutvolumens jede Minute die Leber durchfließen und circa 100 Millionen Lymphozyten aus dem peripheren Blut in 24 Stunden durch die Leber zirkulieren (24). Des Weiteren ist sie durch das Blut aus der Vena portale Eintrittspforte für viele Antigene, die über den Verdauungstrakt aufgenommen werden. Die Leber muss es schaffen eine Balance zwischen Selbsttoleranz, Toleranz gegenüber nicht pathologischen Molekülen und der Immunantwort gegen Pathogene zu bilden und zu erhalten. Die Mechanismen dieser Balance sind noch nicht vollständig geklärt. Bei bestimmten Krankheiten ist diese Balance aus dem Gleichgewicht gebracht wie z.B. bei viralen und autoimmunen Hepatitiden.

Es ist zu vermuten, dass die Balance auch im Zustand der Immunsuppression nach oLTX aus dem Gleichgewicht gebracht werden kann.

Die Leber besteht zu 60-80 % aus parenchymalen Zellen, im Detail zu 60 % aus Hepatozyten, zu 20 % aus Endothelzellen, zu 10 % aus Lymphozyten, zu 8 % aus Kupffer Zellen, zu 2 % aus Gallengangzellen und zu 0,1 % aus Sternzellen. Die T Lymphozyten werden in CD4+ und CD8+ Zellen unterteilt. Die Verteilung der Lymphozyten in der Leber ist variabel und verschiebt sich vom Ruhezustand mit mehr CD8+ T-Zellen als CD4+ Zellen zu einem Verhältnis mit mehr CD4+ T-Zellen als CD8+ T-Zellen im Zustand einer Inflammation oder Abstoßung (26). Die zwei Subklassen der CD4+ Zellen, die Th<sub>1</sub> und Th<sub>2</sub> Zellen, haben ein unterschiedliches Cytokinexpressionsmuster. Th<sub>1</sub> Zellen verhalten sich eher inflammatorisch und sekretieren IFN- $\gamma$ , welches wiederum die Sekretion von IP10 und MIG fördert. Im Gegensatz dazu verhalten sich die Th<sub>2</sub> Zellen überwiegend antiinflammatorisch und sekretieren IL 4. Das Verhältnis dieser beiden zu einander bestimmt die Stärke einer Immunantwort, also auch einer Abstoßung. Des Weiteren findet man in der Leber auch eine T-Zellpopulation die CD8 und CD4 negativ ist. Diese Zellen haben regulatorische Funktionen während Immunreaktionen (24) indem sie Effektor T-Zellen durch Antigen-spezifische Methoden hemmen (25). Ortsständige Makrophagen in den Lebersinusoiden werden als Kupffer Zellen bezeichnet und scheinen auch eine Rolle in der Entwicklung der Toleranz nach oLTX zu spielen, z. B. indem sie durch Stickstoffmonoxid-Produktion die T-Zell Aktivierung unterdrücken können (27, 28). Die Sternzellen der Leber spielen eine wichtige Rolle bei der Leukozytenlenkung indem sie Chemokine sezernieren, wie z.B. *monocyte*



*chemoattractant protein 1* (MCP1), welches an den Rezeptor CCR 5 bindet (29). Gallengangepithelzellen stehen in sehr engem Zusammenhang mit dem Immunsystem. Sie können sowohl direkt als antigen-präsentierende Zellen agieren, als auch Botenstoffe aussenden. Hier spielt das INF- $\gamma$  eine bedeutende Rolle (30), welches das entscheidende Cytokin für die Expressierung von MIG und IP10 ist. Die sinusiodalen Endothelzellen (SLECs) sind die wahrscheinlich wichtigsten antigen-präsentierenden Zellen der Leber und haben als einzige Zellen dieser Art die Fähigkeit ohne Stimulation, wie z.B. durch INF- $\gamma$ , exogene Antigene den naiven CD4+ Zellen zu präsentieren (31). Diese Zellen werden dann aber nicht zu Th<sub>1</sub> Zellen, sondern zu regulatorischen T-Zellen, welche IL4 und IL10 ausschütten. Dies bedeutet, dass die Antigenpräsentation über diesen Weg zu einer Verminderung der Th<sub>1</sub> Immunantwort führt (32). Regulatorische T-Zellen können über eine Kreuz-Präsentation von Antigenen mit MHC I Molekülen von CD8+ Zellen diese aktivieren (33). Außerdem können CD8+ Zellen über antigenpräsentierende Zellen des Spenders aktiviert werden. Beide Aktivierungswege führen in der Leber zu einer antigenspezifischen Toleranz durch entweder einer ineffizienten Aktivierung für eine Immunreaktion oder über die Einleitung einer Apoptose der CD8+ Zellen (36). Die Arbeitsgruppe um D. Bowen (37) vertritt sogar die Ansicht, dass der Ort der T-Zell Aktivierung, Lymphknoten oder Leber, über Toleranz oder Abstoßung beziehungsweise Autoimmunerkrankung entscheidet. Dieser Mechanismus wird auch als Grund für die verbesserte Toleranz von anderen Organtransplantaten bei zeitgleicher Lebertransplantation gesehen. S. Qian und Mitarbeiter (38) und A. Sharland und Mitarbeiter (39) zeigten, dass

die Akzeptanz einer Spenderleber mit der Akkumulation von abgestorbenen T-Zellen in dieser assoziiert ist.

In der Literatur wird beschrieben, dass eine frühe akute Abstoßung nach oLTX keine signifikant negativen Auswirkungen auf die Prognose des Patienten oder das Organüberleben hat und auch nicht zwingend in eine chronische Form übergehen muss, sondern folgenlos ausheilen kann (12). Einige Autoren sprechen sogar von einem signifikant erhöhten Patienten- und Organüberleben(9).

Die hyperakute Abstoßung ist bei Lebertransplantation deutlich seltener als bei anderen Organen, weil die Leber Komplement-vermittelte Zytotoxizität besser toleriert als andere Organe (13). Das wird den großen Mengen löslicher MHC Molekülen, die die Leber freisetzt, zugeschrieben (18). Nach oLTX ist der klinische Verlauf bei schlechter HLA- oder ABO- Übereinstimmung sowie bei positivem Crossmatch deutlich besser, als bei anderen Organtransplantationen. Bei kombinierten Nieren-Lebertransplantationen kann man sogar im Vergleich zur solitären Nierentransplantation eine verminderte Abstoßungsrate für die transplantierte Niere feststellen (13).

## **1.2 Chemokine**

Chemokine sind chemoattraktive Zytokine mit einem Molekulargewicht von 8-12 kD. Über 50 Chemokine und 14 Chemokinrezeptoren sind inzwischen identifiziert. Einige Chemokine binden mehr als einen Rezeptor und viele Chemokinrezeptoren binden mehr als ein Chemokin. Man spricht auch von einer großen Redundance und Promiskuität im Chemokinsystem, jedoch gibt es

Ausnahmen. So binden zum Beispiel die hier untersuchten Chemokine IP 10 und MIG nur an den Rezeptor CXCR3. Alle Chemokinrezeptoren bestehen aus einem G-Protein Rezeptor mit sieben transmembranen Einheiten. Der Rezeptor führt bei Ligandenbindung zu einer intrazellulären Calciumerhöhung, welche wiederum die Phospholipase C $\beta$  aktiviert. Chemokine interagieren aber nicht nur mit Chemokinrezeptoren, sondern auch mit Glykoaminoglycinen von Zelloberflächen (16).

Chemokine sind nicht nur in der Lage inflammatorische Zellen anzulocken, sondern sind auch in die Angiogenese, Mitogenese, Organogenese und Hämatopoese involviert. Des Weiteren gibt es Chemokine, die kontinuierlich ausgeschüttet werden, um so einen basalen Leukozytenverkehr zu gewährleisten. Die Chemokine selber werden in vier Hauptgruppen, abhängig von der Cystein Position, eingeteilt. In der Familie der CC-Chemokine sind die zwei Cysteingruppen am N-terminalen Ende direkt über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die Familie der C-Chemokine besteht nur aus einem Vertreter, dem Lymphotactin, und zeichnet sich durch eine Cysteingruppe am N-terminalen Ende aus. Die Familie der CX3C-Chemokine besteht ebenfalls nur aus einem Vertreter, dem Fraktalkine oder Neurotactin. Hier sind zwischen den beiden N-terminalen Cysteingruppen drei Aminosäuren angeordnet. Dieses Chemokin ist ein Membranprotein. Die Familie der CXC-Chemokine ist charakterisiert durch eine variable Aminosäure zwischen den N-terminalen Cysteingruppen. Diese Familie wird weiter unterteilt in ELR und NON-ELR-CXC Chemokine, wobei ELR für die Aminosäuren Glutamat-Leucin-Arginin am Ende des CXC-Komplexes steht. Die ELR-CXC-Chemokine, z. B. das Interleukin 8, sind wichtig für die Chemotaxis von neutrophilen Zel-

len und die Angiogenese. Die NON-ELR-CXC-Chemokine hingegen sind für die Chemotaxis von mononukleären Zellen und für Angiostase verantwortlich (15). Zu den NON-ELR-CXC-Chemokinen gehören das Interferon (IFN)- $\gamma$ -inducible Protein (IP10; bzw. CXCL 10), das monokine induced by IFN- $\gamma$  (MIG; bzw. CXCL 9) und IFN- $\gamma$  inducible T-Zell alpha Chemoattractant (I-TAC; bzw. CXCL 11). Der Chemokinrezeptor CXCR3 wird auf Th<sub>1</sub> Zellen (CD4<sup>+</sup>) in deutlich höherem Maße exprimiert als auf Th<sub>2</sub> Zellen und Th<sub>1</sub> Zellen sezernieren auch in deutlich höherem Maße INF- $\gamma$ , welches MIG und IP10 induziert (17). IP10 und MIG binden als Antagonisten auch an den Chemokinrezeptor CCR3, welcher vermehrt auf Th<sub>2</sub> Zellen gefunden wird. Loetscher (84) beschrieb, dass IP10, MIG und I-TAC mit den Liganden für CCR3 (Eotaxin, Eotaxin-2, MCP-2, MCP-3, MCP-4, Rantes) um die Bindungsstelle konkurrieren aber den Rezeptor nicht aktivieren. Das bedeutet, dass IP10 und MIG einerseits Th<sub>1</sub> Zellen rekrutieren, und andererseits die Rekrutierung von Th<sub>2</sub> Zellen unterdrücken und somit die Polarisation der T-Zell Rekrutierung noch verstärken. Durch die Besonderheit von CXCR3 vor allem auf IL2 aktivierten T-Lymphozyten stark exprimiert zu sein (34), sind CXCL 9-11 im Sinne einer Aktivierung spezifisch für IL2-aktivierte T-Lymphozyten (23). Die hohe Selektivität von IP10, MIG und ITAC für CXCR3 und umgekehrt die selektive Induzierbarkeit dieser drei Chemokine durch INF- $\gamma$  sowie die besonders ausgeprägte Expression von CXCR3 auf IL2 stimulierten Th<sub>1</sub>-Zellen sprechen für eine Sonderstellung dieser drei Chemokine und ihres Rezeptors in dem großen und vielfältigen System der Chemokine und machen sie zu einem besonders interessanten und erfolgsversprechenden Forschungsobjekt.

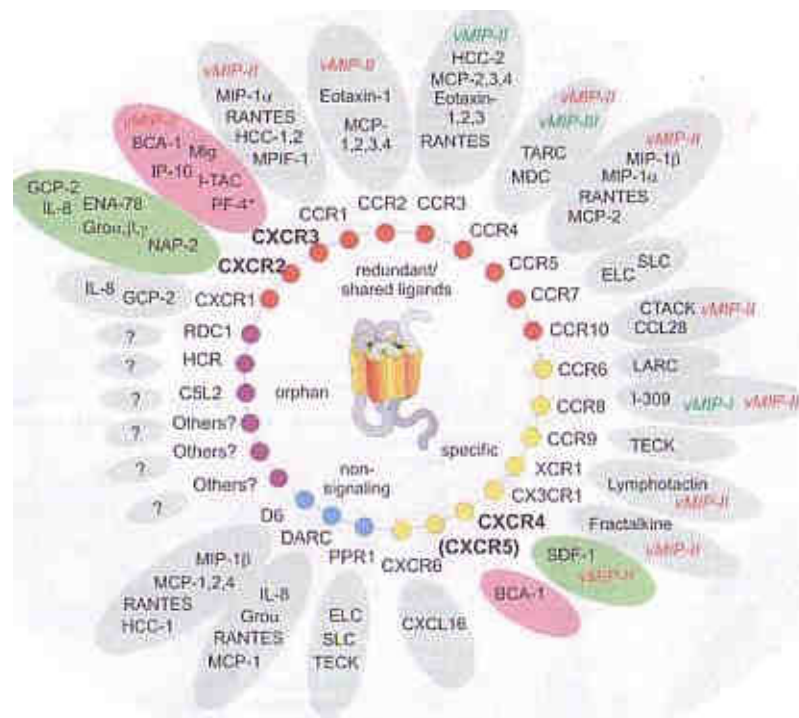


Abb. 2 Das Chemokine System. Innerer Kreis Chemokinrezeptoren, äußerer Kreis Chemokine(16).

Die Leber ist aufgrund ihrer hohen Aktivität an Chemokinen ausgezeichnet geeignet zur Erforschung des Chemokinsystems. Die meisten Zelltypen der Leber sind in der Lage Chemokinrezeptoren zu exprimieren oder Chemokine zu sezernieren. Von besonderer Bedeutung sind hier die Kupfer Zellen (15).

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Die immunologischen Prozesse während und nach einer Transplantation sind entscheidend für die Prognose des Patienten. Das Chemokinsystem spielt dabei eine bedeutende Rolle. Es ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, durch welche Umstände die Expression der Chemokine beeinflusst wird. Zur entscheidenden Verbesserung des Verständnisses für das Chemokinsystem während und nach Lebertransplantation wurde in dieser Studie erstmals die mRNA Expression der Chemokine IP10 und MIG sowie deren Rezeptor CXCR3 mittels quantitativer Taqman-PCR in humanen Lebertransplantaten untersucht. Es soll gezeigt werden, dass diese Methode zur Messung des Chemokinmusters in der Leber während und nach oLTX geeignet ist. Die Studie prüft den signifikanten Zusammenhang der mRNA-Expression der Chemokine IP10 und MIG sowie deren Rezeptor CXCR3, erstens mit Abstoßungsgeschehen nach Lebertransplantation, zweitens mit der Qualität des Spenderorgans und drittens mit dem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) bei Lebertransplantation.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv**

In die Studie wurden 21 erwachsenen Patienten eingeschlossen, die an der MHH eine Verstorbenen-Lebertransplantation erhielten. Davon waren 52,4 % (n=11) Frauen und 47,6 % (n=10) Männer. Das Alter zum Zeitpunkt der Transplantation betrug im Mittelwert 44 Jahre und 331,2 Tage (Median: 47 Jahre und 23 Tage, Max: 66 Jahre und 44 Tage, Min: 18 Jahre und 97 Tage).

Den Beobachtungszeitraum von 2 Jahren überlebten 18 der 21 Patienten/ Patientinnen. Eine Patientin verstarb direkt post operativ, eine weiterer 47 Tage nach Transplantation aufgrund einer akuten Abstoßung und ein Patient verstarb sechs Tage post operativ an einem Multiorganversagen.

Die Grunderkrankungen der Patienten teilen sich wie in Tabelle 1 dargestellt auf.

| Patient | Grund für die LTX              | Weitere Diagnose                              | Verstorben im Beobachtungszeitraum      |
|---------|--------------------------------|---|---|
| 1       | Hepatitis B                    | HCC im Explantat                              | nein                                    |
| 2       | Alkoholtoxische Leberzirrhose  |   | nein                                    |
| 3       | HCC                            |   | nein                                    |
| 4       | Hämatochromatose               |   | am Tag der oLTX durch Kreislaufversagen |
| 5       | portocavaler Shunt, HCC        | HCC nicht bestätigt im Explantat              | nein                                    |
| 6       | PBC, PSC                       |   | nein                                    |
| 7       | PSC                            |   | nein                                    |
| 8       | PSC                            |   | nein                                    |
| 9       | Alkoholtoxische Leberzirrhose  |   | nein                                    |
| 10      | Hepatitis B, Hämatochromatose  | HCC   | nein                                    |
| 11      | PSC                            | Colitis ulcerosa                              | nein                                    |
| 12      | Alkoholtoxische Leberzirrhose  |   | nein                                    |
| 13      | subakutes unkl. Leberversagen  |   | nein                                    |
| 14      | PSC                            | Retransplantation                             | nein                                    |
| 15      | PSC                            |   | nein                                    |
| 16      | PSC                            | Splitleber                                    | nein                                    |
| 17      | AIH overlap PBC                |   | nein                                    |
| 18      | chronische Hepatitis C         |   | nein                                    |
| 19      | PSC                            | Colitis ulcerosa, CCC im Explantat            | nein                                    |
| 20      | Medikamententoxische Hepatitis | Retransplantation                             | 43 Tage nach oLTX durch Abstoßung       |
| 21      | Hepatitis C                    | Retransplantation, Hepatorenales Syndrom, NTX | 6 Tage nach oLTX an Multiorganversagen  |

Tabelle 1 Patientenkollektiv der Studie mit Grunderkrankung und Überleben. oLTX= Lebertransplantation

NTX= Nierentransplantation, HCC= Hepato-Celluläres-Carcinom, CCC= Cholangio-Celluläres-Carcinom, PSC= primär sklerosierende Cholangitis, PBC= primär biliäre Cirrhose, AIH= Autoimmunhepatitis



Die Todesursachen der Organspender teilen sich in intracerebrale Blutungen (n=13), Polytraumata (n=2), hypoxische Hirnschäden (n=3) und einen A. vertebralis Verschluss auf. Bei den Transplantationen handelt es sich bei 20 Patienten um eine Full-Size-Transplantation. Ein Patient hat im Rahmen einer Split-Leber-Transplantation einen rechten Leberlappen (Segment IV-VIII) erhalten. Drei der Transplantationen waren Re-Transplantationen.

Die Konservierung erfolgte bei 10 Spenderorgane mit der University of Wisconsin Solution (UW) und bei 11 Spenderorgane mit der Histidine-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK). Die durchschnittliche kalte Ischiämiezeit betrug 11 Stunden 40 min (Median: 11h 45 min, Range: 7h 28 min, Max: 15h 35min, Min: 8h 7min). Die durchschnittliche warme Ischiämiezeit betrug 41,67 min (Median: 40 min, Max: 63 min, Min: 29 min).

Die immunsuppressive Therapie teilte sich unter den 21 Patienten wie folgt auf: Eine Patientin verstarb direkt postoperativ von den anderen 20 Patienten erhielten 17 Patienten initial Ciclosporin A als Basisimmunsuppression. Von den 17 initial mit Ciclosporin A behandelten Patienten wurden 7 im Verlauf auf Tacrolimus umgestellt. Drei Patienten erhielten initial Tacrolimus. 19 Patienten erhielten zusätzlich 2 Gaben Basiliximab nach Schema (Tag 0+4). Mycophenolat Mofetil (MMF; CellCept®) erhielten als zusätzliches Immunsuppressivum sechs Patienten, vier bei viraler Hepatitis, einer bei Primär Sklerosierender Cholangitis und einer bei Autoimmunhepatitis. Rapamune erhielten zusätzlich drei Patienten bei maligner Neoplasie. Mit Ausnahme von drei Patienten mit viraler Hepatitis erhielten alle Patienten Prednisolon, welches nach zentrumsüblichem Schema im Verlauf reduzierte wurde

(1.-6.Tag 15 mg/m<sup>2</sup> KOF, ab 7.Tag 10 mg/m<sup>2</sup> KOF, ab 14.Tag 7,5 mg/m<sup>2</sup> KOF, ab 28.Tag 4 mg/m<sup>2</sup> KOF, ab 3.Monat 2,5 mg/m<sup>2</sup> KOF, ab 4.Monat 1 mg/m<sup>2</sup> KOF).

## 2.2 Probengewinnung

Die Leberbiopsate wurden nach Einverständnis der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) und Einwilligung der Patienten (Formular siehe Anhang) während der Präparation und nach Reperfusion der Spenderorgane in den Operationssälen der Viszeral- und Transplantationschirurgie der MHH entnommen. Die Entnahme erfolgte entweder als *en bloc* Schnitt oder als Stanzbiopsie. Das entnommene Gewebe wurde sofort unter sterilen Bedingungen in ein DNS freies Röhrchen verbracht. Der Transport ins Labor erfolgte unmittelbar und unter Kühlung in Flüssigstickstoff. Im Labor wurden die Proben bei -80° C gelagert. Die post operativen Biopsate wurden in einem Zeitraum von 10-18 Tagen nach Transplantation entnommen. Die Entnahme fand unter Ultraschallkontrolle als Feinnadelpunktion statt. Die Hälfte der jeweiligen Biopsie wurde in Flüssigstickstoff ins Labor transportiert und dort bei -80°C gelagert, die andere Hälfte zur histologischen Untersuchung in die Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover verschickt.

## 2.3 Probenaufbereitung

### 2.3.1 Aufbereitung durch die Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH)

Wie oben erwähnt wurde von den Stanzbiopsaten zum Zeitpunkt drei, also 10- 18 Tage nach oLTX, jeweils ein Teil der Biopsie in die pathologische Abteilung der MHH zur histologischen Aufbereitung und Befundung geschickt. Die Einteilung der Abstoßungsre-

aktion erfolgte in gering, leicht, mäßig und schwer (siehe Einleitung 1.1.5.4.2).

### 2.3.2 Aufschließen, Homogenisieren und Aufbereiten der Proben

Die einzelnen Gewebeproben wurden spätestens innerhalb von einem Monat nach Gewinnung aufgeschlossen und homogenisiert. Hierfür wurde das RNeasy Mini Set der Firma Qiagen und ein Rotor-Stator-Stab zum Homogenisieren verwendet. Die Proben wurden zunächst auf Trockeneis in die für die Aufschließung notwendigen kleinen Stücke zerteilt. Daraufhin wurden die stecknadelkopf großen Probenstücke mit 600 µl RLT Puffer versetzt und circa 20-40 sec mit dem Rotor-Stator-Homogenisator homogenisiert und zeitgleich aufgeschlossen. Ein Aufschluss der Zellwände sowie Zell- und Organmembranen ist absolut notwendig, um sämtliche in der Probe vorhandene RNS beziehungsweise mRNA freizusetzen. Ein unvollständiger Aufschluss würde zu einer verminderten mRNA Ausbeute führen. Die Homogenisation vermindert die Viskosität des Zelllysats, genomische DNA und hochmolekulare Zellbestandteile werden gesichert, so dass man ein homogenes Lysat erhält, welches Voraussetzung für eine effektive Bindung der mRNA an die RNeasy Membran im nächsten Arbeitsschritt ist.

Das aufgeschlossene und homogenisierte Gewebe wurde zunächst eine halbe Minute bei 15.000 U/min zentrifugiert und der Überstand (das Lysat) wurde zur Weiterverarbeitung in einem 1,5 ml Eppendorfhütchen mit 600 µl 70% Äthanol vermischt. Mit Äthanol wurde die selektive Bindung der mRNA an die RNeasy Silica-gel-Membran begünstigt. Das mit Äthanol versetzte Lysat wurde

auf eine RNeasy Mini Säule aufgetragen und 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen. Jetzt wurde die Spinnsäule in eine neues 2 ml Eppendorfhütchen gesetzt und 700 µl RW1 Puffer über die Spinnsäule pipettiert und anschließend 15 Sekunden bei 10.000 U/m in zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Die Spinnsäule wurde auf ein neues 2 ml Eppendorfhütchen gesetzt und es wurden 500 µl RPE Puffer über die Spinnsäule gegeben und bei 10.000 U/min 15 Sekunden zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde einmal bei maximaler Umdrehung für 3 Minuten wiederholt. Um Pufferverschleppungen auszuschließen wurde die Spinnsäule auf ein neues 1,5 ml Eppendorfhütchen gesetzt und ein weiteres Mal bei maximaler Umdrehung für eine Minute zentrifugiert. Der nächste Schritt war die Elution der an die Silicagel Membran der Spinnsäule gebundenen mRNS. Dafür wurde die Spinnsäule auf ein neues 1,5 ml Eppendorfhütchen gesetzt, 40 µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert und bei 10.000 U/min eine Minute zentrifugiert. Dann wurde die Spinnsäule verworfen. In dem 1,5 ml Eppendorfhütchen befand sich die RNS Ausbeute in 40 µl RNase freiem Wasser. Dieses wurde bis zur weiteren Verarbeitung wieder bei -80°C gelagert, doch zuvor wurde n 5 µl aus den 40 µl mRNS Produkt entnommen, um die gewonnenen mRNS Menge und ihre Reinheit durch photometrische Messung zu bestimmen.

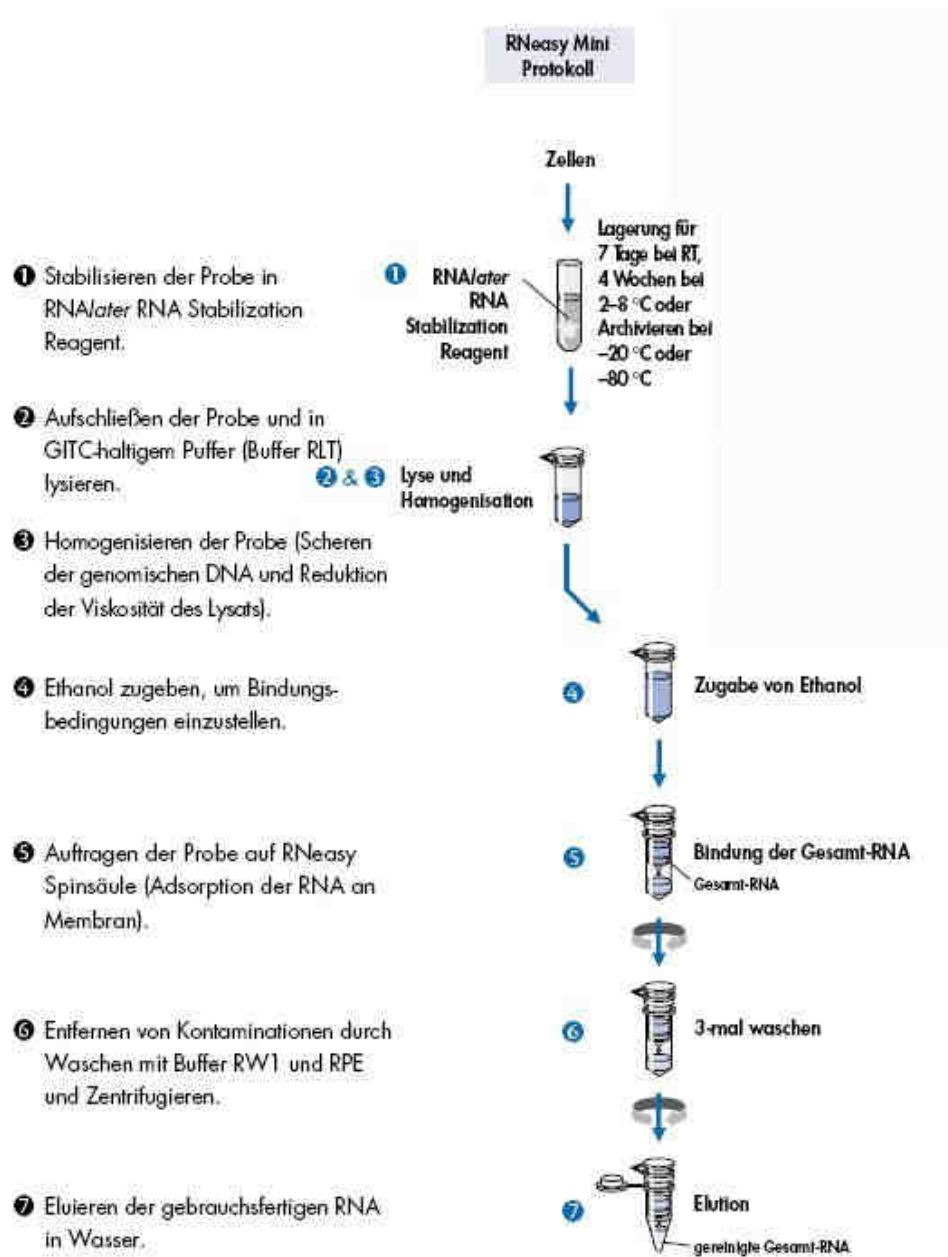


Abb. 3 Arbeitsschritte zur Gewinnung von RNS aus Gewebe (Quelle : RNeasy Handbuch Quagen)

### 2.3.3 Photometrische Messung der RNS Ausbeute

Zur photometrischen Messung wurden 5 µl der mRNS mit 75 µl Ampuwa (RNase freies Wasser) verdünnt. Diese 80 µl wurden dann luftblasenfrei in die Küvette gegeben und im zuvor mit 80 µl Ampuwa geeichten Photometer gemessen. Hierbei lässt sich aus dem Messwert für die Wellenlänge bei 260 nm die Menge der mRNS -Ausbaute errechnen. Eine Absorption von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer RNS-Konzentration von 40 µg/ml, also ist:  $40 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$  (hier 16, da 5 µl mRNS auf 75 µl Ampuwa)  $\times$  die gemessene Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm = die Konzentration an mRNS in dem entsprechenden Eluat. Multipliziert man diese mit dem Volumen des Eluats (0,04 ml) bekommt man die absolute RNS Menge des entsprechenden 40 µl Eluat mit RNase freiem Wasser. Die Reinheit der mRNS wird durch die Ratio der Absorption bei 260 nm zu 280 nm berechnet. Der Schwellenwert für die Weiterverarbeitung der RNS-Probe wurde für diese Studie mit einer Ratio von 1,7 festgelegt.

### 2.3.4 RT-Prozeß mittels „Two Enzyme Assay“

Eine RT-PCR kann als „one-enzyme/one-tube“ Ansatz oder als „two-enzyme/two-tube“ Ansatz durchgeführt werden. Dies bedeutet, dass der Schritt der Umschreibung der RNS in DNS und die eigentliche PCR entweder in einem „Eppendorfhütchen“ von einem Enzym oder in verschiedenen „Eppendorfhütchen“ von verschiedenen Enzymen, zeitlich getrennt voneinander, stattfindet. Ein Nachteil der „two-enzyme/two-tube“ Methode ist, dass sie mehr potentielle Quellen der Kontamination bietet, jedoch gewinnt man stabilere cDNS, die gelagert und mehrmals genutzt werden

kann. Des Weiteren ist diese Methode doppelt so sensitiv wie der „one-enzyme/one-tube“ Ansatz (56, 57)

Für diese Studie wurde die „two-enzyme/two-tube“ Methode gewählt, welche wie folgt durchgeführt wurde. Mit der aus dem vorausgegangenen Arbeitsschritt bekannten mRNS Menge in 40 µl Eluat, wird das Volumen bestimmt, dass maximal 1 µg mRNS enthält und mit Ampuwa auf 27 µl aufgefüllt. Dazu wurde dann 1 µl Random Primer gegeben und die Reagenz 10 Minute bei 65 °C inkubiert. Während der Inkubation wurde der RT-Mix, der unter anderem die MMLV- Transkriptase (Moloney Murine Leukemia Virus-Transkriptase) und die dNTP's enthielt, auf Eis angefertigt. Der Mix setzte sich im Einzelnen für jede Probe wie folgt zusammen: 0,4 µl 1% BSA , 0,4 µl DTT (Dithiothreitol) , 0,8 µl RNasin, 1 µl 10xdTNP (Gemisch der 4 dNTP's), 8 µl 5xPuffer (250 mM Tris/Cl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCL), 1,4 µl MMLV-Transkriptase. Dieser RT-Mix mit einem Volumen von 12 µl wurde jeder Random-Primer-mRNS-inkubierten Probe (nach Abkühlen dieser) zugesetzt. Das neue Gesamtvolumen von 40 µl wurde 60 min bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit fand die Umschreibung der mRNS in cDNS statt. Danach wurde der Vorgang bei 65°C für 10 Minuten beendet und die Probe in Eiswasser abgekühlt. Die jetzt erzeugte cDNS wurde zunächst wieder im Gefrierschrank bei -80 °C gelagert.

*Random Primer versus Spezifische Primer.* Man kann für den RT Prozess sowohl spezifische Primer als auch Random Primer nutzen. Die spezifischen Primer minimieren die Hintergrundamplifikation und erhöhen so die Spezifität, da sie die Verfälschung der Ergebnisse durch Kontamination vermindern. Bei kleinen Probenvolumina und demzufolge wenig RNS Material ist es sinn-

voller Random Primer zu benutzen. Es muss aber beachtet werden, dass die gemessene mRNA Menge leicht zu hoch gemessen wird (55). Aufgrund der geringen Mengen von zur Verfügung stehendem Probenmaterial, besonders bei den postoperativen Stanzbiopsate, wurden für diese Studie Random Primer benutzt.

*Das Moloney murine leukaemia virus reverse Transkriptions Enzym (MMLV-Reverse-Transkriptase)* ist eine RNA abhängige DNA-Polymerase, welche eine deutlich geringere endogene RNAse Aktivität wie zum Beispiel die robustere Avian-Myoblastosis-Virus-Reverse-Transkriptase besitzt (54, 53). In dieser Studie wurde die reverse Transkription mit dem Moloney murine leukaemia virus reverse Transkriptions Enzym (MMLV-RT) durchgeführt, weil das Ziel die Amplifikation der mRNA eines gesamten Gens war.

*RNasin* ist eine RNAse Inhibitor für eukaryote RNasen und ist unter anderem mit MMLV-RT kompatibel und gut für die Real-Time-PCR geeignet (20).

*DTT= Dithiothreitol* ( $C_4H_{10}O_2S_2$ ) ist eine chemische Verbindung zur Stabilisierung von sulfhydrylhaltigen Enzymen. Es verhindert die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfidbrücken durch Luftsauerstoff.

*BSA* ist bovines Serum Albumin und verhindert eine PCR Inhibition durch Verunreinigungen.



## 2.3.5 TaqMan Real Time RT- PCR mit ABI- PRISM 7700 SDS

### 2.3.5.1 Grundlagen

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren, um diese dann in stark amplifizierter Menge auf unterschiedliche Weisen darstellen zu können. Die Methode wurde 1983 von Kary B. Mullis entdeckt und beschrieben. Die PCR funktioniert nur mit DNS, so dass man für die Untersuchung von RNS diese zuerst durch eine reverse Transkription in cDNS umschreiben muss. Demzufolge ist die spezifische PCR von RNS die RT-PCR (reverse Transkriptase PCR). Ein Zyklus der PCR besteht aus drei Schritten. Der Zyklus wird mehrfach wiederholt. Im ersten Schritt wird durch eine Temperaturerhöhung auf 90°C eine Denaturierung der DNS erzeugt. Im zweiten Schritt lagern sich die dem Reaktionsansatz hinzu gegebenen Primer an die DNS Einzelstränge an. Dazu wird die Temperatur auf 35-55 °C abgekühlt. Diesen Schritt nennt man „Annealing“. Die „Primer“ werden in „Sense“ und „Antisense“ Primer unterschieden. Sie bilden im ersten Zyklus jeweils an ihrem DNS Einzelstrang den Startpunkt für die DNS-Polymerase, welche mit zugefügten dNTP's einen komplementären Strang zur Ursprungs- DNS schreibt. Dieser dritte Schritt wird „Extension“ genannt und findet bei einer Temperatur von 72 °C statt, um weitere „Annealing – Prozesse“ zu vermeiden. Dies ist der Grund warum man für die PCR eine thermostabile DNS-Polymerase verwenden muss. Man verwendet hierfür die DNS-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, welches in heißen Quellen des Yellowstone Nationalparks gefunden wurde. Der nächste Schritt ist der erste Schritt des zweiten Zyklus. Das bedeutet es ist eine De-

naturierung, nämlich die von der neu gebildeten DNS inklusive „Primer“ und der Ursprungs-DNS. Im zweiten Schritt des 2. Zyklus binden die „Primer“ unter Anderem in jeweils gegensätzlicher Weise an die neu synthetisierte DNS, so dass hier nur noch die Sequenz zwischen „Sense“- und „Antisense Primer“ kopiert wird. Damit kopiert man ab dem zweiten Zyklus selektiv den durch das Design der „Primer“ ausgewählten Abschnitt zwischen ihnen und erreicht in den weiteren Zyklen eine Amplifikation dieser Sequenz. Zum Darstellen dieser durch RT-PCR amplifizierten mRNS gibt es verschiedene Verfahren. Für diese Studie wurde das Verfahren der TaqMan-Real- Time-RT-PCR gewählt. Bei diesem Verfahren wird bei jedem Extensions Schritt an jedem DNS-Strang Licht bestimmter Wellenlänge freigesetzt, welches durch den ABI Prism 7700 SDS gemessen wird. Durch den exponentiellen Anstieg der PCR-Produkte kommt es zu einem exponentiellen Anstieg des emittierten Lichtes. Die Lichtemission wird dadurch erzeugt, dass zusätzlich zu den Primern noch eine Sonde entwickelt wird, welche zwischen den Primern im Bereich der untersuchten Sequenz liegt. Diese Sonde wird am 5' Ende mit einem Farbstoff versehen, welcher Licht emittiert, sobald die Sonde von der DNS-Polymerase beim kopieren der Sequenz von der DNS gelöst und hydrolysiert wird. Nur hydrolysierte Sonden senden das Reportersignal, da zuvor der am 3'-Ende der Sonde befindliche „Quencher“ durch Energietransfer das Reportersignal absorbiert. Es werden nur an DNS gebundene Sonden hydrolysiert, somit ist das Reportersignal strikt sequenzspezifisch. Schwankungen des Reportersignals, die durch Fluoreszenz, Fluktuationen oder Veränderung im Volumen oder Konzentration entstehen, werden durch die passive interne Referenz ROX vom Gerät automatisch normalisiert.



Abb. 4. Primer und Sonde mit Reporter- und Quencher- Farbstoff lagern sich sequenzspezifisch an den DNS Strang. (Quelle: 7700 SDS Workshop, Applied Biosystems)



Abb. 5. AmpliTaq-DNS-Polymerase synthetisiert komplementären DNS Strang und setzt Sonde mit Farbstoff durch 5'  $\rightarrow$  3' Exonuklease Aktivität frei. (Quelle: 7700 SDS Workshop, Applied Biosystems)

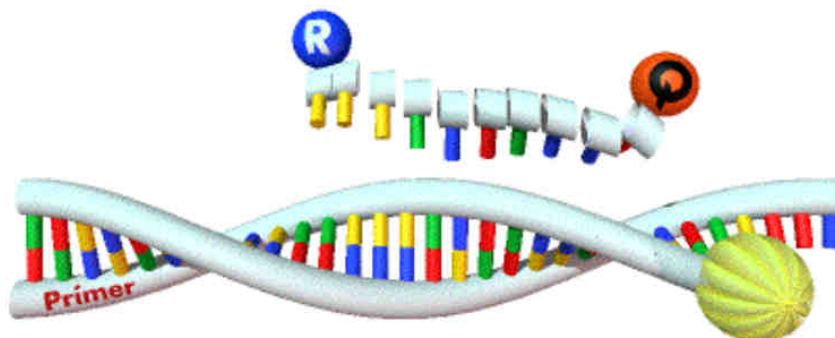


Abb. 6. Die Sonde mit Farbstoff und Quencher wird hydrolysiert. (Quelle: 7700 SDS Workshop, Applied Biosystems)

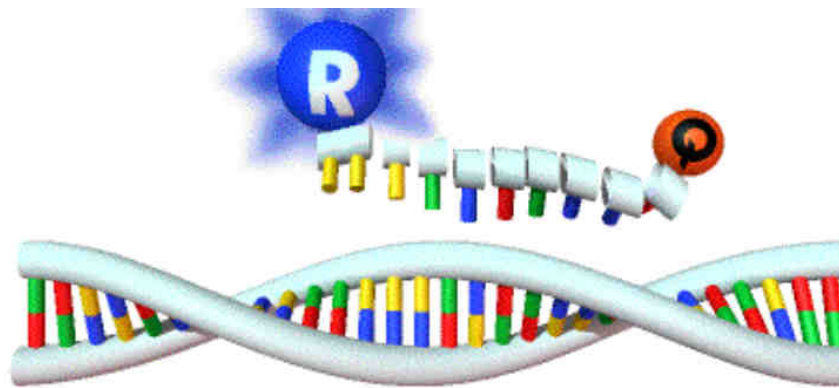


Abb. 7. Mit der Zahl der hydrolysierten Sonden beziehungsweise Menge der kopierten Sequenz steigt das Reportersignal exponential an. (Quelle: 7700 SDS Workshop, Applied Biosystems)

#### 2.3.5.2 Vor- und Nachteile der PCR

Die Durchführung dieser Studie mittels der TaqMan RT-PCR und die Auswertung anhand der delta Ct und delta-delta Ct Methode bietet diverse Vorteile, wie zum Beispiel die hohe Sensitivität aus sehr geringem Probenvolumen (51). Ein weiterer Vorteil ist die gute Reproduzierbarkeit durch standardisierte Reagenzlösungen und die Durchführbarkeit für einen größeren Pool Proben, aufgrund der Zeit- und Kostenersparnis durch diese Methode. Nachteile dieser Methode sind vor allem die geringe Spezifität (52) und die hohe Empfindlichkeit für Kontamination. Für die Auswertung anhand der oben genannten Methoden spricht die Möglichkeit, viele Proben in einem PCR-Durchgang zu messen und so Messvarianzen durch verschiedene Messdurchgänge zu minimieren. Besonders entscheidend sind bei dieser Methode die sorgfältige Auswahl des „Housekeepinggens“ und die Gleichheit der Effizienz der PCR für die gemessenen Zielgene und das „Housekeepinggen“.

#### 2.3.5.3 Besondere Aspekte bei Primer- und Sondendesign

Durch die räumliche Nähe von „Reporter“- und „Quencher“-Farbstoff kommt es zu einem Fluoreszenz-Energie-Transfer. Nachdem

man zunächst davon ausging, dass beide Farbstoffe in unmittelbarer Nachbarschaft platziert werden sollten, hat man später festgestellt, dass sich die optimale Position für den „Quencher“ am 3'Ende der Sonde befindet. Dadurch wird auch der erste, endonukleolytische Schritt der Reaktion detektiert und das PCR-Produkt in vollem Umfang nachgewiesen.

Den größten Einfluss auf den „Quenching-Effekt“ hat der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren, da mit größer werdendem Abstand die  $Mg^{2+}$  Ionenkonzentration einen entscheidenden Einfluss hat. Dieser Effekt wird der elektrostatischen Abstoßung der negativ geladenen Phosphatreste des Moleküls zugeschrieben. Durch diesen Effekt nimmt das Molekül eine gestreckte Form an und der Abstand zwischen den beiden Farbstoffen vergrößert sich, was zu einer Abschwächung der Reaktion und somit der Detektion führt. Mit der zugesetzten  $Mg^{2+}$  Ionenkonzentration (typische Sondenkonzentrationen liegen zwischen 3,5-6 mM) werden die Abstoßungskräfte neutralisiert und durch die vorhandene Flexibilität kann sich die Sonde wieder falten. Neben der Ionenkonzentration kann die Sondenflexibilität auch durch Sekundärstrukturen oder Selbstkomplementarität (Hairpins) beeinflusst werden. Von entscheidender Bedeutung für einen optimalen Quenchingvorgang ist auch die Reinheit der Sonde.

Um eine Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'Exonuklease-Aktivität zu erreichen, muss zunächst eine stabile Hybridisierung an der Zielsequenz erfolgen. Diese Stabilität erreicht man bei Beachtung der üblichen Regeln zur Auswahl von Sonden (GC-Sondengehalt 50%, Vermeidung von drei gleichen Nukleotiden hintereinander, Vermeidung der Komplementarität zu den beiden PCR-Primern). Für die Erzielung einer ausreichenden Son-

denspezifität sollte die Länge der Sonde maximal 20 bis 30 Nukleotide betragen, wobei die optimale Länge zwischen 24 und 30 Nukleotiden liegt. Die Sonde sollte am 5'Ende kein G haben, weil dies auch nach Hydrolyse das Reportersignals absorbieren bzw. „quenchen“ kann. Die  $T_m$  (Schmelztemperatur) sollte 10 °C über der der Primer liegen.

Prinzipiell besteht die Möglichkeit, die Sonde ubiquitär innerhalb des Amplicons zu platzieren, wobei der Strang mit dem höheren GC-Gehalt gewählt werden sollte. Idealerweise liegt das 5'Ende der Sonde in relativer Nachbarschaft des 3'Endes des „PCR-Primers“. Es ist darauf zu achten, dass beide Sequenzen sich nicht überlappen. Obwohl kein Mindestabstand zwischen beiden Sequenzen eingehalten werden muss, hat sich eine Entfernung von 50 bis 60 Basenpaare etabliert. Die Entwicklung „der Primer“ sollte grundsätzlich nach der Auswahl der Sonde erfolgen. Zur Erstellung „der Primer“ stehen mehrere Programme zu Verfügung. Hier wurde „die Primer Express Software“ von Applied Biosystems benutzt. „Die Primer“ sollten eine Länge 15-20 Basenpaaren haben. Der G/C Gehalt sollte zwischen 20-70 % liegen. Es sollte möglichst keine oligo T-Bereiche geben, um unspezifische Anlagerungen zu vermeiden. Weiterhin sollten keine palindromen Sequenzen vorkommen. Eine 3'-Komplementarität zwischen „Sense“- und „Antisense Primer“ sollte auf jeden Fall vermieden werden, aufgrund der Gefahr der Dimerbildung. Die  $T_m$  „der Primer“ sollte zwischen 58-60 °C liegen.

#### 2.3.5.4 Spezifisches Design der PCR in dieser Studie

In dieser Studie wurde eine RT-Real Time PCR mit dem ABI-Prism 7700 der Firma Applied Biosystems nach dem Taqman Prinzip durchgeführt. Es wurde die Genexpression der Studiengene MIG(CXCL9), IP10 (CXCL10) und CXCR 3 sowie des Housekeepinggens GAPDH gemessen. Es wurde hierfür der TaqMan Universal PCR Master Mix von Applied Biosystems benutzt. Folgende Primer und Sonden wurden genutzt.

CXCL 10 Sense-Primer:

5 'CAA GGC TTC CCC ATG TTC

CXCL 10 Antisense-Primer:

5 'GCC ACT TTC ACT GCT TTT ACC

CXCL 10 Sonde:

5' 6FAM- AgA ggA CgC TgT CTT TgC ATA ggC CC-Darbacyl

CXCL 9 Sense-Primer:

5' GCA AGG AAC CCC AGT AGT GA

CXCL 9 Antisense-Primer:

5'GGA TAG TCC CTT GGT TGG TG

CXCL 9 Sonde:

5'BoTMR- AAA ggg TCg CTg TTC CTg CAT CA- Darbacyl

CXCR 3 Sense-Primer:

5' TGG CCG AGA AAG CAG GGT AG

CXCR 3 Antisense-Primer:

5' AGC AGT GCA TGT AGC CCA GG

CXCR 3 Sonde

5' TET-CgT ggC CAA gTC ggT CAC CTC A-Darbacyl

GAPDH:

TaqMan RT-PCR GAPDH Set Human der Firma Applied Biosystems

### 2.3.5.5 Protokoll der durchgeführten PCR

#### 2.3.5.5.1 PCR Protokoll für MIG (CXCL9) und IP10 (CXCL10)

Zunächst wurde ein Teil der gewonnenen cDNS der jeweiligen Probe verdünnt, um dann mit dem für mehrere Proben angefertigten Master Mix zusammengeführt zu werden. Aus diesem Ansatz wurden je Probe drei Messplätze auf einer Mikrotiterplatte (Well) beschickt, so dass je Gen und Probe immer eine Dreifachbestimmung erfolgte.

Probenverdünnung: 0,4 µl cDNS + 19,6 µl RNase

freies Wasser

Master Mix Ansatz (für ein Well = 20 µl) :

- 12,5 µl TaqMan Universal PCR

Master MIX

- Sense Primer MIG 0,75 µl

- Sense Primer IP10 0,75 µl

- Antisense Primer MIG 0,75 µl

- Antisense Primer IP10 0,75 µl

- MIG Sonde 1 µl

- IP10 Sonde 1 µl

- H<sub>2</sub>O 2,5 µl

Die Chemokine MIG (CXCL9) und IP10 (CXCL10) wurden im selben Well gemessen. Dies vermindert die Messvarianzen durch viele PCR Durchgänge.

#### 2.3.5.5.2 PCR Protokoll für CXCR3

Auch hier wurde zunächst ein Teil der gewonnenen cDNS von jeder Probe mit Wasser verdünnt und dann mit dem für mehrere Proben angesetzten Master Mix zusammengeführt und auf drei Wells je Probe verteilt.



Probenverdünnung: 0,4 µl cDNS + 19,6 µl RNase

freies Wasser

Master Mix Ansatz (für ein Well = 20 µl):

- 12,5 µl TaqMan Universal

PCR Master MIX

- Sense Primer 1,5 µl

- Antisense Primer 1,5 µl

- Sonde 1 µl

- H<sub>2</sub>O 3,5 µl

#### 2.3.5.5.3 PCR Protokoll für GAPDH

Es wird wieder die cDNS verdünnt und ein Master Mix für mehrere Proben erstellt der mit der cDNS für jede Probe in drei Wells pipetiert wird.

Probenverdünnung: 0,4 µl cDNS + 19,6 µl RNase

freies Wasser

Master Mix Ansatz (für ein Well = 20 µl) :

- 12,5 µl TaqMan Universal

PCR Master MIX

- PDAR 1,25 µl

- H<sub>2</sub>O 6,25 µl

#### 2.3.5.6 *Ablauf und Ergebnisse der PCR*

Für jeden PCR- Durchgang wurde eine Platte mit 96 Wells bestückt. Jedes Messreagenz wurde in drei Wells gemessen. Dies diente auch zur Qualitätskontrolle. Aus den drei „Threshold Cycle Werten“ (Ct Werten) wurde der Mittelwert gebildet und der weiteren Auswertung zugeführt. Es wurden bei jedem Durchgang die gemessenen Gene auch aus einer Standardprobe gemessen. Diese diente als interne Referenz zur Demaskierung von Messvarianzen gemessen. Des Weiteren wurde bei jedem Durchgang für die gemessenen Gene eine Nullprobe gemessen, um Verunreini-

ungen auszuschließen. Die PCR wurde bei folgender Einstellung im Zwei-Schritt Modus durchgeführt: Step 1 50°C für 2 Minuten, Step 2 95°C für 10 Minuten dann 40 Zyklen mit je 95 °C für 15 Sekunden und 60°C für eine Minute.

Das Ergebnis einer PCR stellt sich in den „Threshold Cycle Werten“ da. Diese geben die Zykluszahl wieder, bei der die gemessene Fluoreszenz exponentiell ansteigt. Aus der Zykluszahl, ab der die Replikation exponentiell ansteigt, kann man die relative Menge der entsprechenden cDNS zu Beginn der PCR schließen. Die Software des SDS 7700 ABI-Prism setzt die Thresholdlinie 10 Standardabweichungen über die „Baseline“. Die so gewonnenen Ct Werte wurden exportiert, in einer Exeltabelle verwaltet und der Quantifizierung zugeführt.

#### 2.3.5.7 Quantifizierung / Effizienz

Die exportierten Ct Werte wurden mit den jeweiligen Werten der Standardprobe des Durchgangs quantifiziert, um Messvarianzen der verschiedenen Durchgänge auszuschließen.

Für die Anwendung der relativen Quantifizierung ohne Standardkurve ist zur Auswertung eine Effizienzbestimmung der PCR für jedes Gen erforderlich. Diese wurde durch eine Verdünnungsreihe für jedes Gen ermittelt. Hierzu werden die jeweiligen Ct Werte der Verdünnungsreihe als Funktion eines Zehner-Logarithmus graphisch aufgetragen und die Steigung dieser linearen Funktion bestimmt. Die Effizienz errechnet sich dann durch  $E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$  (21, 22). Die Effizienzen der einzelnen PCRs konnten in dieser Studie wie folgt gemessen werden: IP10=1,903; MIG=1,901; CXCR3=2,04; GAPDH=1,901, womit

die Voraussetzungen für eine relative Quantifizierung der Ergebnisse gegeben waren.

#### 2.3.5.8 Auswertung

Es wurden die Ct Werte der Gene der jeweiligen Probe in ein Verhältnis zu den Ct Werten des Housekeepinggens GAPDH in der entsprechenden Probe gesetzt. Der Ct Wert des Housekeepinggens wurde von dem des Zielgens subtrahiert. Dieser Wert wurde als negativer Exponent zur Basis 2 genommen. Multipliziert man diesen Wert mit hundert erhält man einen Prozentwert, der die Prozent der Genexpression des Zielgens wiedergibt, wenn in der entsprechenden Probe die Housekeepinggen-Expression, in unserer Studie die GAPDH-Expression, hundert Prozent entsprechen soll. Diese Methode bezeichnet man als delta Ct Methode. Sie benötigt als Voraussetzung eine nahezu gleiche Effizienz der PCR der Zielgene und des Housekeepinggens, was für diese Studie als gegeben gezeigt werden konnte. Der delta Ct Wert beschreibt die relative Expression eines Zielgens bezogen auf das Housekeepinggen in der jeweiligen Probe. Hat man verschiedene Proben im Verlauf kann man damit eine Verschiebung des Genmusters darstellen. Da man davon ausgeht, dass die mRNA des Housekeepinggens konstant exprimiert wird, muss die Verschiebung durch eine Veränderung der mRNA Menge des Kandidatengens bedingt sein. (21, 22)

Nach Bildung einer Kontroll- und Beobachtungsgruppe kann die delta,delta Ct Methode angewandt werden. Hier wird die Differenz aus der Differenz der Beobachtungsgruppe (Ct-Wert Zielgen – Ct-Wert Housekeepinggen) und der Differenz der Kontrollgruppe (Ct-Wert Zielgen – Ct-Wert Housekeepinggen) gebildet und dieser Wert dann als negativer Exponent zur Basis 2 gesetzt. Genauer

ist das Effizienz korrigierte delta,delta Ct Modell. Welches sich wie folgt berechnet: Ratio =

$$\frac{(\text{Effizienz}_{\text{Zielgen}})^{\text{Ct Wert Zielgen Kontrolle- Beobachtung}}}{(\text{Effizienz}_{\text{Housekeepinggen}})^{\text{Ct Wert Housekeepinggen Kontrolle- Beobachtung}}}$$

(21, 22). Diese Methode, sowie die delta Ct Methode, wurde in dieser Studie zur Auswertung der PCR Ergebnisse benutzt. Dafür wurde sowohl delta Ct aus den jeweiligen Werten des Zielgens und des Housekeepinggens für jede einzelne Biopsie berechnet, als auch delta,delta Ct Werte aus dem zeitlichen Verlauf der Biopsien. Es ist wichtig nicht die Ct Werte als Rohwerte zu verarbeiten, da es sich um einen exponentiellen Ausdruck handelt (44). Für die Beabreitung, Verwaltung und Auswertung der PCR Ergebnisse und sämtlicher anderer Studiendaten wurde das Programm Microsoft Excel 2002 von Microsoft angewandt.

Kritisch bezüglich der Auswertung an einem Housekeepinggen ist die Auswahl des Housekeepinggens. In dieser Studie wurde GAPDH als Housekeepinggen verwendet, weil verschiedene Vorarbeiten von Herrn Professor M.Melter und anderen Arbeitsgruppen (62) gezeigt haben, dass dieses ein sinnvolles Housekeepinggen ist. So zeigten Wall SJ und Mitarbeiter (87) in ihrer Studie über MMP13 Expression in der Wundheilung der Haut bei diabetischen und nicht diabetischen Mäusen, dass bei der real time RT-PCR Methode mit relativer Quantifizierung an dem Housekeepinggen GAPDH keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse gemessen werden konnten im Vergleich zu der gleichen Methode mit 18s rRNS als Housekeepinggen. 18s rRNS wiederum wurde von Bustin und Mitarbeiter als das am geringsten regulierte Housekeepinggen beschrieben. Des Weiteren konnten Wall SJ und Mitarbeiter (87) mit dieser Methode keinen Unterschied in der MMP13 Expression bei diabetischen und nicht diabetischen

Expression bei diabetischen und nicht diabetischen Mäusen feststellen. Dies zeigt, dass ein Diabetes die GAPDH Expression nicht beeinflusst. Andere Arbeiten zeigten, dass GAPDH durchaus variabel in seiner Expression sein kann. Bustin hat nachgewiesen, dass die GAPDH Expression zwischen einzelnen Individuen variiert und diverse andere Arbeitsgruppen zeigten einen Anstieg der Expression bei Hypoxie, bei oxidativem Stress, bei Inflammation sowie bei Apoptose (58, 60, 59). Chang (61) zeigte im Rattenmodell, dass GAPDH beim Hepatotom hochreguliert wird. Die bisher umfangreichste Studie über GAPDH Expression mittels TaqMan RT-PCR haben Barber und Mitarbeiter durchgeführt (64). Sie konnten zeigen, dass die GAPDH Expression sehr unterschiedlich ist, abhängig vom untersuchten Gewebe. Wie sich auch aus der physiologischen Funktion des Enzyms herleiten lässt, ist es in Geweben mit hohem Energiebedarf, wie zum Beispiel dem Skelettmuskel, in höherem Maße exprimiert. Sie konnten auch zeigen, dass die Expression in einem Gewebe nur gering variiert und dass die Expression weder vom Geschlecht noch vom Alter des Gewebespenders abhängt. Für die Blutgefäße und für die Leber konnten sie zeigen, dass die Zeit zwischen Gewebeentnahme, Cross-clamp und Schockgefrieren keinen Einfluss auf die GAPDH mRNA Expression hat. Dies spricht dafür, dass der Ischämie-Reperfusionsschaden, der in unserer Studie die Zielgenexpression beeinflusst, die von CXCR3 sogar signifikant, die GAPDH Expression nicht beeinflusst.

### 2.3.6 Statistik

Die Statistik wurde mit Hilfe von SPSS Version 15.0 der Firma SPSS erstellt.

### *2.3.6.1 Prüfung des Zusammenhangs von Abstoßung und Chemokin- sowie Chemokinrezeptorexpression*

Nach Ermittlung der delta Ct werte nach oben genannten Methoden wurden die Ergebnisse folgenden statistischen Tests zugeführt. Da die Bedingung einer Normalverteilung nicht erfüllt werden konnten, wurden nicht-parametrische Tests für unverbundene Stichproben benutzt, hier insbesondere der Test nach Mann-Whitney und nach Kruskal-Wallis. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde bei 0,05 festgesetzt.

### *2.3.6.2 Untersuchung der prognostischen Aussagekraft der Genexpression*

Ab einem Ct Wert von  $\geq 0,2$  für das entsprechende Zielgen wird hier von einer Genexpression ausgegangen. Es ist dann möglich mit der Genexpression als Risikofaktor und der Abstoßung als unerwünschtes Ereignis Vierfeldertafeln zu bilden und daraus die Sensivität, die Spezifität, die Odds Ratio, das relatives Risiko, den negativen prädiktiven Wert und den positiv prädiktiven Wert zu berechnen. Hierfür wurden der verbundene Test nach Friedman und exakte Test nach Fisher angewandt. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde bei 0,05 festgesetzt. Zur Prüfung der Validität und Qualität der diagnostischen Aussage der Zielgenexpression wurden Receiver Operating Characteristic Curves (ROC Kurven) erstellt (106).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klinischer Verlauf der Studienpatienten

Von den 21 in der Studie eingeschlossenen Patienten sind in den ersten 24 Monaten nach oLTX 3 Patienten (14,3%) verstorben. Eine Patientin verstarb direkt postoperativ an einem katecholamin-refraktären Kreislaufversagen bei fortgeschrittener kompletter Thrombosierung des mesenterico-portalen Venenstammes. Eine weitere Patientin hatte 39 Tage nach oLTX eine schwere Abstoßung und verstarb nach 43 Tagen an globaler Leberinsuffizienz. Der dritte Patient ist 6 Tage nach kombinierter Nieren- und Lebertransplantation an Multiorganversagen verstorben. Demzufolge sind drei Patienten früh nach der Transplantation verstorben. Die anderen 17 Patienten überlebten den Beobachtungszeitraums von 24 Monaten. Es wurde bei 21 Patienten je eine Biopsie zum Zeitpunkt Eins (während der „Backtable-Präparation“) und bei 21 Patienten je eine Biopsie zum Zeitpunkt Zwei (kurz nach Reperfusion) durchgeführt. Bei 16 Patienten wurde eine Biopsie 6-23 Tage (Median 14,5 Tage; Mittelwert 15,6 Tage; Standardabweichung 4,2 Tage) nach oLTX durchgeführt. In dieser Biopsie hatten 2 Patienten keine Abstoßung (12,5%) und 14 von 16 Patienten (87,5%) hatten eine Abstoßung. Die Abstoßungsschwere wurde histologisch als gering bei 2 Patienten (12,5%), als leicht bei 4 Patienten (25%) und als mäßig bei 8 Patienten (50%) klassifiziert. Dies entspricht der in der Literatur beschriebenen Häufigkeit von Abstoßungen, die in Routinebiopsien in den ersten Wochen nach oLTX gefunden werden (98). Insgesamt hatten 16 Patienten des Gesamtkollektivs von 21 Patienten innerhalb der ersten 24 Monate

mindestens eine Abstoßung (80%) und 7 Patienten hatten mindestens zwei Abstoßungen (35%). 12 Patienten hatten im Verlauf mindestens eine mäßige Abstoßung (60%).

### **3.2 Relative Genexpression nach delta Ct Methode**

Es wurde die relative Genexpression der Zielgene in Bezug auf die Genexpression des Housekeepinggens GAPDH berechnet. In Tabelle 2 und 3 sind die Ergebnisse der relativen Genexpression nach der delta Ct Methode nach Zielgen und Patient sortiert dargestellt. Graphisch sind die Mittelwerte (MW) und die Mediane in den Abbildungen 8-11 aufgezeigt. Es gibt zwei Biopsate deren hohe Genexpressionswerte der Zielgene kritisch zu betrachten sind. Das sind die Werte für die Biopsie zum Zeitpunkt eins des Patienten Nr.7 und die Biopsie zum Zeitpunkt drei des Patient Nr. 15. Beide weisen singulär in der jeweiligen Biopsie einen hohen Ct Wert für GAPDH auf, also eine niedrige Genexpression, demzufolge sind die relativen Genexpressionen der Zielgene sehr hoch bei gleicher absoluter Genexpression.



| Patient | Zeitpunkt | CXCR3  | IP10   | MIG    |
|---------|-----------|--------|--------|--------|
| 1       | 1         | 0,15   | 0,47   | 0,24   |
|         | 2         | 0,16   | 0,68   | 0,25   |
|         | 3         | 0,39   | 0,76   | 0,28   |
| 2       | 1         | 0,05   | 0,16   | 0,02   |
|         | 2         | 0,10   | 0,20   | 0,04   |
|         | 3         | 0,42   | 0,84   | 0,52   |
| 3       | 1         | 6,34   | 6,98   | 1,01   |
|         | 2         | 0,21   | 0,33   | 0,04   |
|         | 3         | 0,09   | 0,10   | 0,03   |
| 4       | 1         | 0,40   | 0,87   | 0,31   |
|         | 2         | 0,49   | 0,92   | 0,31   |
| 5       | 1         | 0,29   | 0,01   | 0,04   |
|         | 2         | 4,97   | 6,89   | 1,04   |
|         | 3         | 0,92   | 1,88   | 0,65   |
| 6       | 1         | 3,52   | 8,54   | 1,25   |
|         | 2         | 41,75  | 52,85  | 9,54   |
|         | 3         | 4,21   | 10,01  | 9,09   |
| 7       | 1         | 414,11 | 365,53 | 102,81 |
|         | 2         | 0,01   | 0,00   | 0,01   |
|         | 3         | 0,48   | 1,18   | 0,34   |
| 8       | 1         | 0,10   | 0,14   | 0,02   |
|         | 2         | 0,04   | 0,06   | 0,02   |
| 9       | 1         | 0,17   | 0,27   | 0,10   |
|         | 2         | 0,92   | 1,14   | 0,49   |
|         | 3         | 0,07   | 0,28   | 0,53   |
| 10      | 1         | 1,47   | 1,70   | 4,09   |
|         | 2         | 1,42   | 1,90   | 0,79   |
|         | 3         | 1,02   | 5,33   | 12,24  |
| 11      | 1         | 0,02   | 0,02   | 0,03   |
|         | 2         | 0,02   | 0,02   | 0,02   |
|         | 3         | 0,07   | 0,22   | 0,40   |
| 12      | 1         | 0,01   | 0,02   | 0,02   |
|         | 2         | 0,03   | 0,06   | 0,02   |
|         | 3         | 0,25   | 0,34   | 0,41   |
| 13      | 1         | 0,01   | 0,02   | 0,01   |
|         | 2         | 0,01   | 0,03   | 0,02   |
|         | 3         | 0,14   | 0,54   | 0,40   |
| 14      | 1         | 0,02   | 0,01   | 0,02   |
|         | 2         | 0,00   | 0,00   | 0,01   |
|         | 3         | 0,03   | 0,09   | 0,16   |
| 15      | 1         | 1,01   | 0,42   | 0,79   |
|         | 2         | 0,18   | 0,35   | 0,29   |
|         | 3         | 13,58  | 23,82  | 7,80   |
| 16      | 1         | 0,02   | 0,02   | 0,01   |
|         | 2         | 0,00   | 0,00   | 0,00   |
| 17      | 1         | 0,02   | 0,04   | 0,02   |
|         | 2         | 0,01   | 0,02   | 0,02   |
| 18      | 1         | 1,33   | 1,08   | 1,27   |
|         | 2         | 0,70   | 0,65   | 0,69   |
|         | 3         | 4,04   | 8,30   | 8,42   |
| 19      | 1         | 0,06   | 0,02   | 0,01   |
|         | 2         | 0,07   | 0,02   | 0,01   |
|         | 3         | 0,47   | 0,32   | 0,09   |
| 20      | 1         | 0,05   | 0,15   | 0,04   |
|         | 2         | 0,02   | 0,05   | 0,06   |
|         | 3         | 0,14   | 0,32   | 0,18   |
| 21      | 1         | 0,07   | 0,02   | 0,03   |
|         | 2         | 0,03   | 0,03   | 0,02   |

Tabelle 2 Relative Genexpression der Chemokine IP10, MIG und ihres Rezeptors CXCR3 zu GAPDH nach delta Ct Methode

CXCR3IP10MIG

|                                  |       |       |       |
|----------------------------------|-------|-------|-------|
| <b>Mittelwert aller Biopsate</b> | 1,62  | 2,48  | 1,13  |
| <b>Standardabweichung</b>        | 5,83  | 7,79  | 2,70  |
| <b>Median</b>                    | 0,14  | 0,28  | 0,16  |
| <b>Minimum</b>                   | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| <b>Maximum</b>                   | 41,75 | 52,85 | 12,24 |
| <b>Range</b>                     | 41,75 | 52,85 | 12,24 |

|  |      |      |      |
|--|------|------|------|
| <b>Mittelwert Biopsate Zeitpunkt 1</b> | 0,76 | 1,05 | 0,47 |
| <b>Standardabweichung</b>              | 1,56 | 2,35 | 0,96 |
| <b>Median</b>                          | 0,09 | 0,14 | 0,04 |
| <b>Minimum</b>                         | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| <b>Maximum</b>                         | 6,34 | 8,54 | 4,09 |
| <b>Range</b>                           | 6,32 | 8,53 | 4,09 |

|  |       |       |      |
|--|-------|-------|------|
| <b>Mittelwert Biopsate Zeitpunkt 2</b> | 2,44  | 3,15  | 0,65 |
| <b>Standardabweichung</b>              | 9,08  | 11,49 | 2,06 |
| <b>Median</b>                          | 0,07  | 0,06  | 0,04 |
| <b>Minimum</b>                         | 0,00  | 0,00  | 0,00 |
| <b>Maximum</b>                         | 41,75 | 52,85 | 9,54 |
| <b>Range</b>                           | 41,75 | 52,85 | 9,54 |

|  |       |       |       |
|--|-------|-------|-------|
| <b>Mittelwert Biopsate Zeitpunkt 3</b> | 1,65  | 3,40  | 2,60  |
| <b>Standardabweichung</b>              | 3,44  | 6,26  | 4,15  |
| <b>Median</b>                          | 0,41  | 0,65  | 0,41  |
| <b>Minimum</b>                         | 0,03  | 0,09  | 0,03  |
| <b>Maximum</b>                         | 13,58 | 23,82 | 12,24 |
| <b>Range</b>                           | 13,56 | 23,73 | 12,21 |

Tabelle 3 Deskriptive Statistik für alle delta Ct Werte

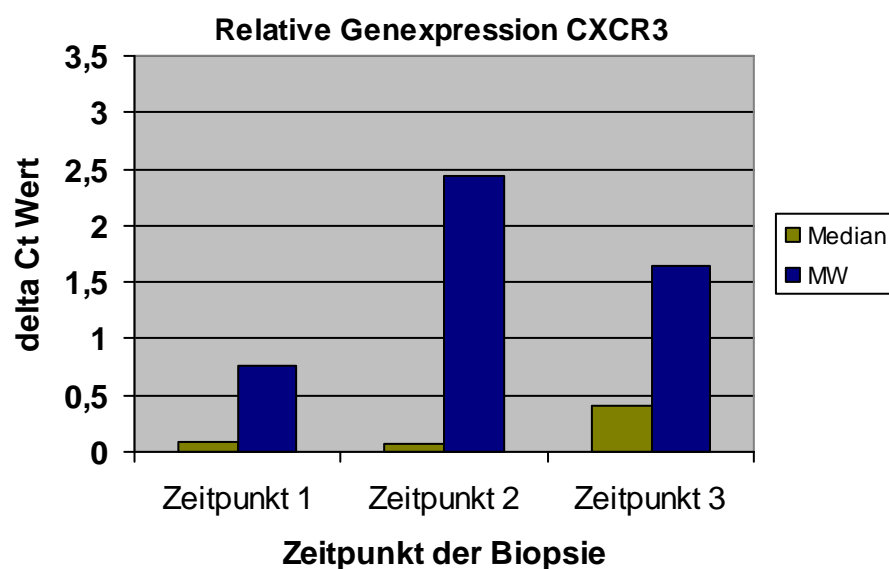


Abb.8 Mittelwerte (MW) und Mediane der relativen Genexpression von CXCR3, aufgeteilt nach Biopsiezeitpunkten.

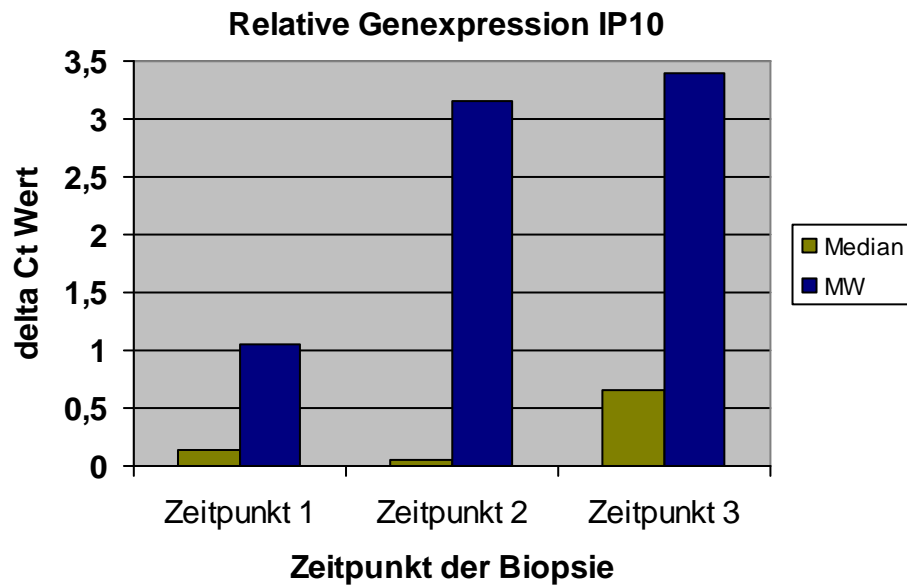


Abb.9 Mittelwerte (MW) und Mediane der relativen Genexpression von IP10, aufgeteilt nach Biopsiezeitpunkten.

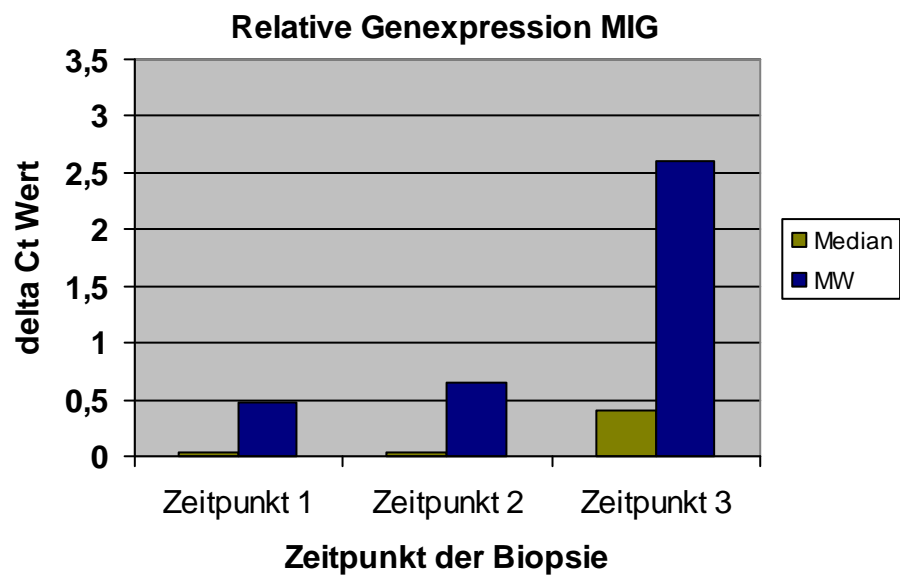


Abb.10 Mittelwerte (MW) und Mediane der relativen Genexpression von MIG, aufgeteilt nach Biopsiezeitpunkten.

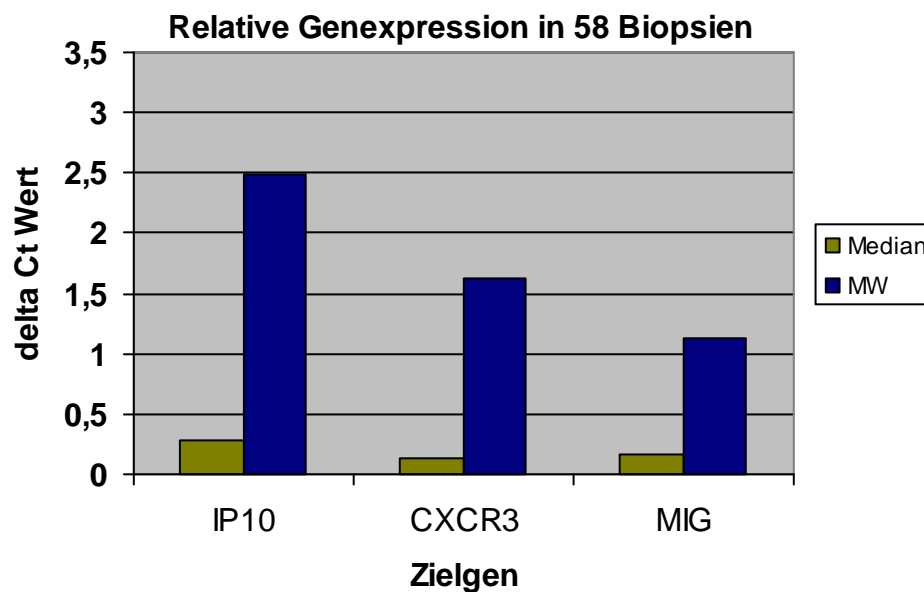


Abb.11 Mittelwerte (MW) und Median der relativen Genexpression in allen Biopsaten, aufgeteilt nach Zielgen

Die Mittelwerte der Expression nehmen außer bei CXCR3 von Biopsie zu Biopsie zu (siehe Abb.8-10). Diese Zunahme ist im Test für verbundene Stichproben nach Friedman für MIG mit einem p Wert von 0,037 und für IP10 mit einem p Wert von 0,032 signifikant.

Die in der PCR gemessenen delta Ct Werte für MIG, IP10 und CXCR3 korrelieren hoch signifikant miteinander (K-Koeffizienten 0,895; 0,918; 0,920).

Der Verlauf der Chemokinexpression der Patienten mit einer höchstens leichten Abstoßung unterscheidet sich von dem der Patienten mit mindestens mäßiger Abstoßung (siehe Abb. 12-14). Die Abstoßungen sind durch die Histologie der Biopsie zum Zeitpunkt Drei definiert.

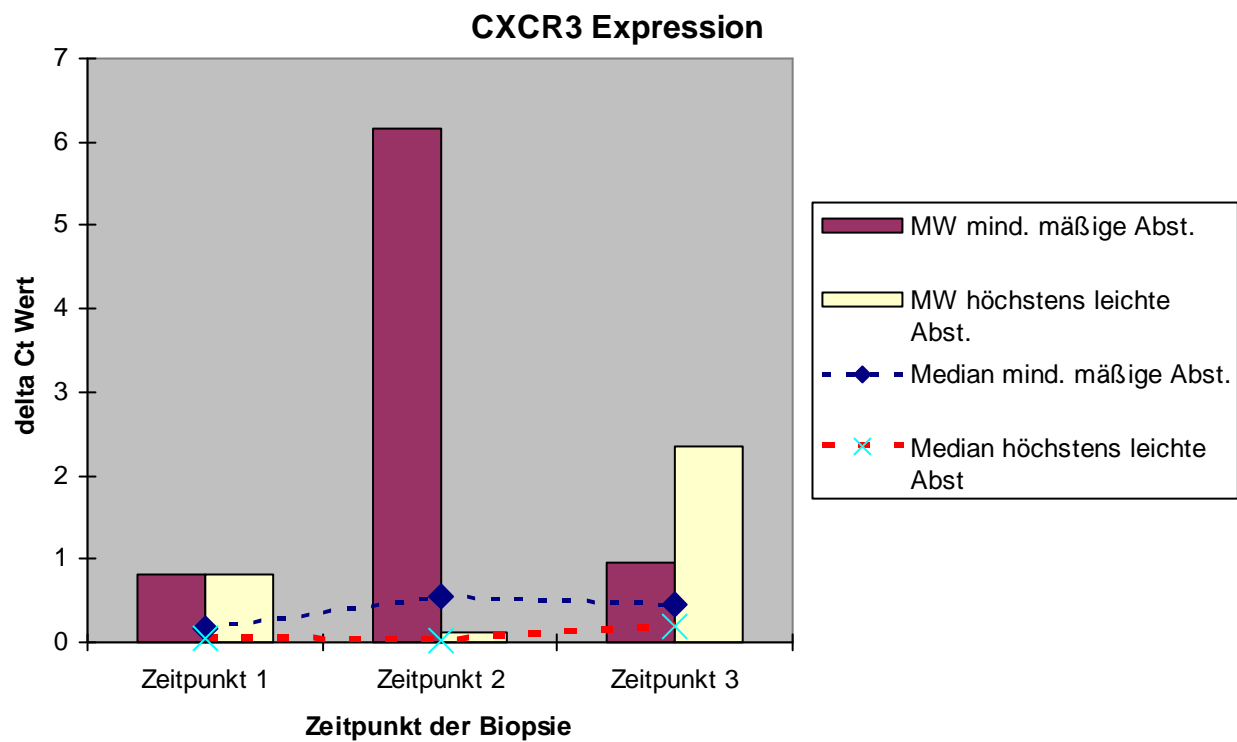


Abbildung 12, CXCR3 Expression Mittelwerte (MW) und Median nach Abstoßungsschwere in 2 Gruppen geteilt

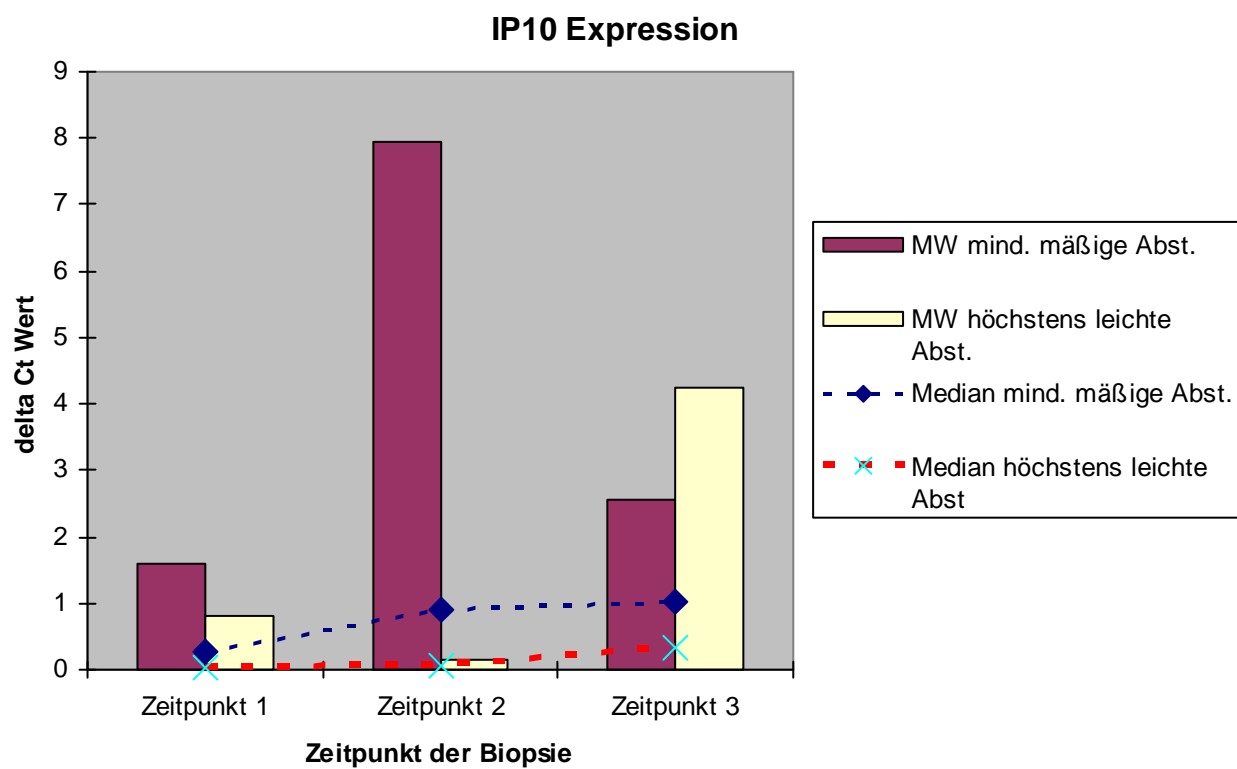


Abbildung 13, IP10 Expression Mittelwerte (MW) und Median nach Abstoßungsschwere in 2 Gruppen geteilt

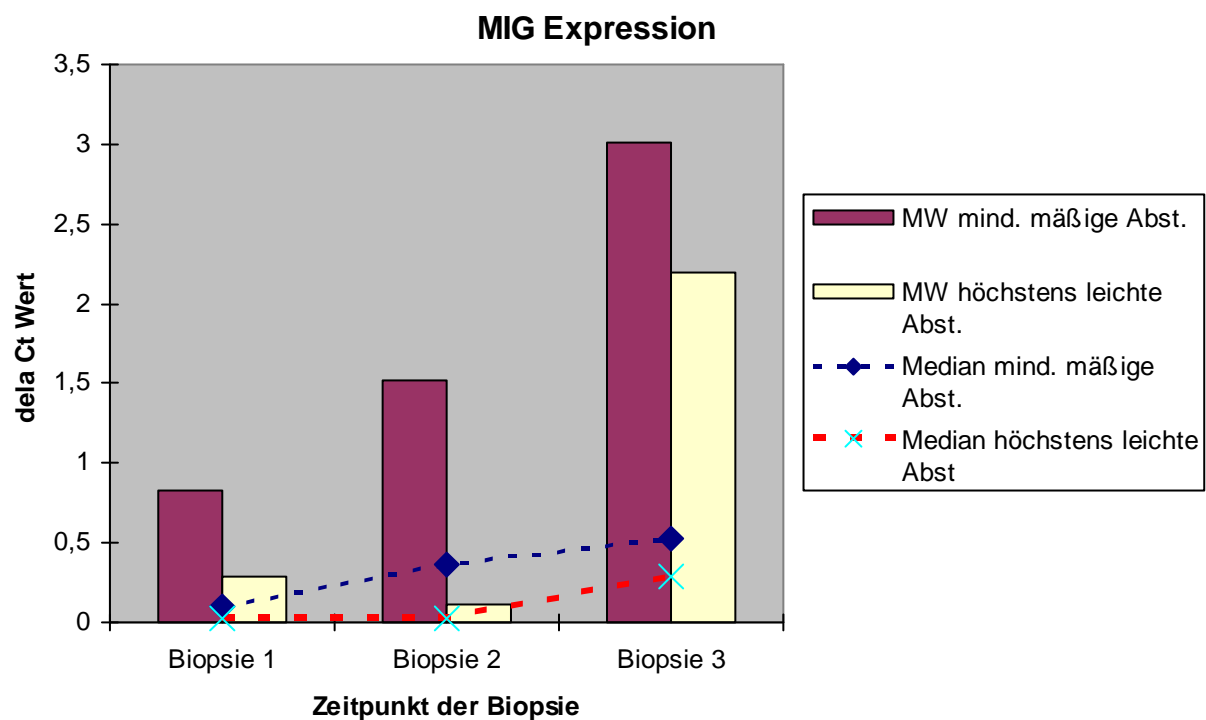


Abbildung 14, MIG Expression Mittelwerte (MW) und Median nach Abstoßungsschwere in 2 Gruppen geteilt

### 3.2.1 Prüfung des Zusammenhangs von Abstoßung und delta Ct Werten mit den Tests nach Mann-Whitney und Kruskal-Wallis

Die Patienten wurden folgend nach Abstoßung und deren Anzahl sowie Schwere in verschiedene Gruppen unterteilt und deren delta Ct Zielgenwerte miteinander verglichen. Die berücksichtigten Abstoßungen sind durch die histologische Beurteilung in der Biopsie zum Zeitpunkt Drei definiert. Die Anzahl der Abstoßungen im Beobachtungszeitraum von 24 Monaten ist durch alle histologisch dokumentierten Abstoßungen definiert.

### 3.2.1.1 Biopsie zum Zeitpunkt **Eins**

Für die Werte aus der Biopsie zum Zeitpunkt Eins, also während der Backtable-Präparation des Spenderorgans, ergeben sich dann folgende Werte. Es wurden 19 Proben ausgewertet.

Die Mittelwerte und der Median der Gruppe mit mindestens mäßiger Abstoßung (n=7) sind im Vergleich höher als bei der Gruppe mit höchstens leichter Abstoßung (n=12). Die Mittelwerte für CXCR3 sind 0,81 zu 0,75 und der Median 0,17 zu 0,06. Die Mittelwerte für MIG sind 0,82 zu 0,27 und der Median 0,1 zu 0,02. Die Mittelwerte für IP10 sind 1,6 zu 0,74 und der Median 0,27 zu 0,03. Die hier gezeigte Tendenz zu höherer Chemokinexpression bei mindestens mäßigen Abstoßungen ist nicht signifikant. Auch zeigt sich mit der stufenweisen Zunahme der histologischen Schwere der Abstoßung keine durchgehend parallele Zunahme der Mittelwerte der Chemokinexpression.

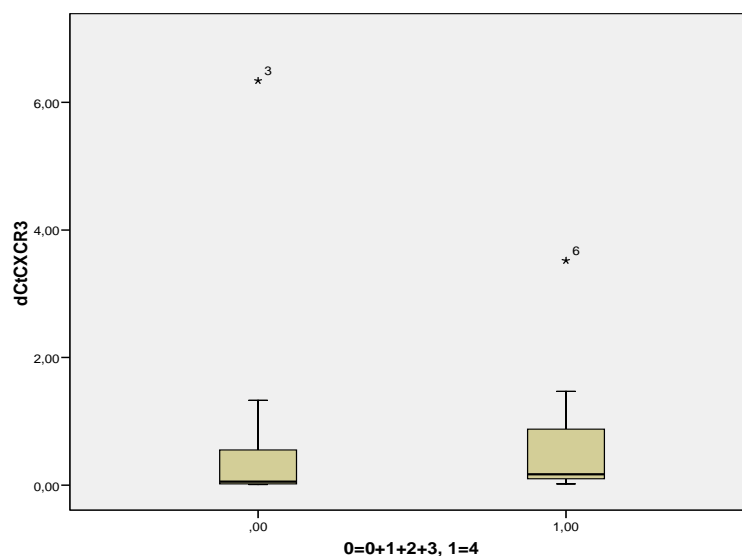


Abb.15 Boxplot für die relative Genexpression (GE) von CXCR 3 in der Gruppe 1 mit mindestens einer mäßigen Abstoßung (4) und der Gruppe 0 mit höchstens einer leichten Abstoßung (0-3).

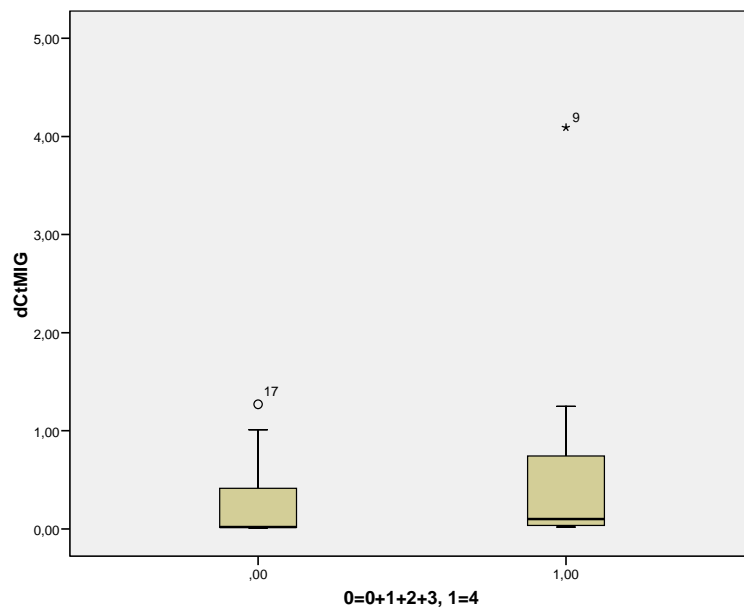


Abb.16 Boxplot für die GE von MIG in der Gruppe 1 mit mindestens einer mäßigen Abstoßung (4) und der Gruppe 0 mit höchstens einer leichten Abstoßung (0-3).

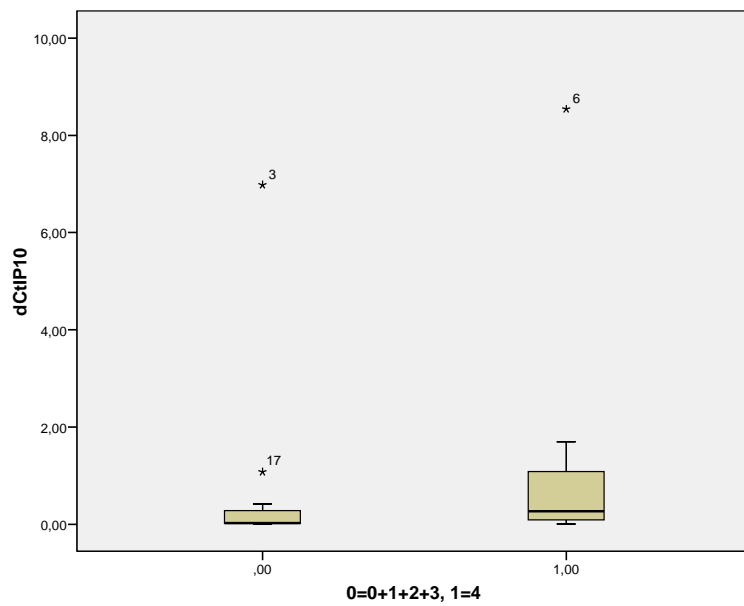


Abb.17 Boxplot für die GE von IP10 in der Gruppe 1 mit mindestens einer mäßigen Abstoßung (4) und der Gruppe 0 mit höchstens einer leichten Abstoßung (0-3).



Beim Vergleich der Gruppe ohne Abstoßung (n=4) mit der Gruppe mit Abstoßung (n=15) erhält man folgende Mittelwerte bzw. Mediana-paare. Für CXCR3 ist der Mittelwert 0,05 zu 0,97 und der Median 0,04 und 0,15. Für MIG ist der Mittelwert 0,02 und 0,6 und der Median 0,02 und 0,4. Für IP10 ist der Mittelwert 0,09 zu 1,32 und der Median 0,09 zu 0,16. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

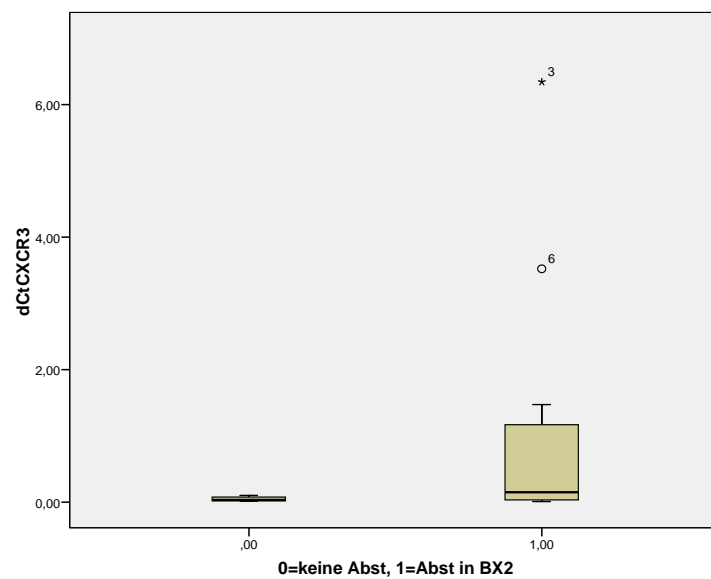


Abb.18 Boxplot für GE von CXCR3 in der Gruppe 0 mit keiner Abstoßung und Gruppe 1 mit Abstoßung in der Biopsie.

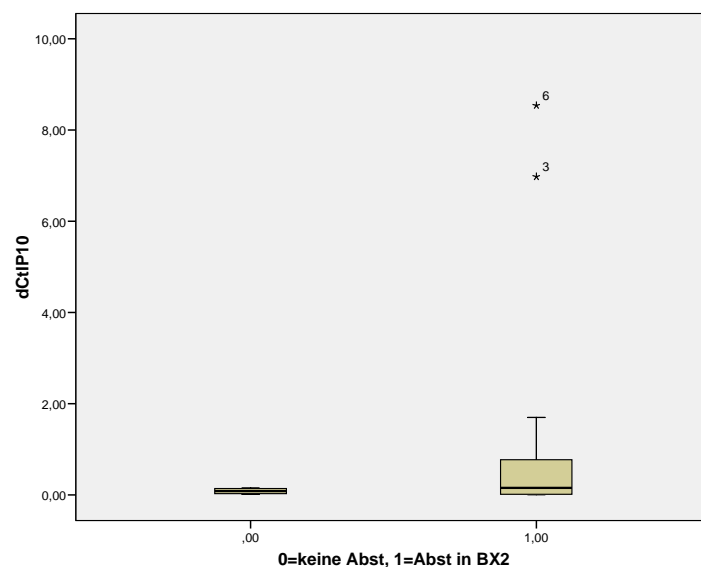


Abb.19 Boxplot für GE von IP10 in der Gruppe 0 mit keiner Abstoßung und Gruppe 1 mit Abstoßung .

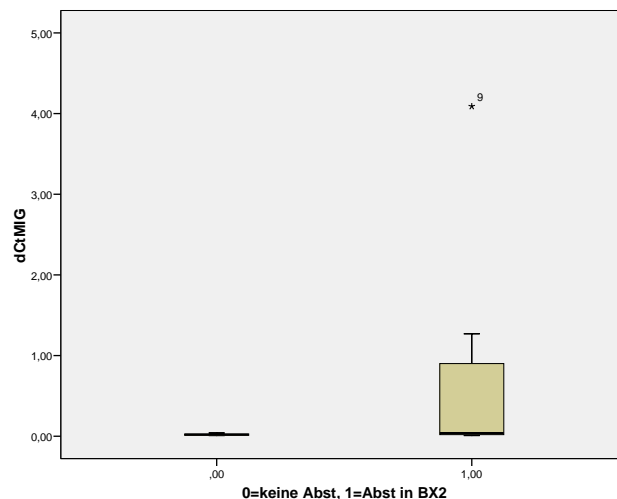


Abb.20 Boxplot für GE von MIG in der Gruppe 0 mit keiner Abstoßung und Gruppe 1 mit Abstoßung.

Es zeigt sich zum Zeitpunkt Eins eine signifikant höhere Chemokineexpression in der Gruppe der Patienten mit mindestens zwei Abstoßungen im Beobachtungszeitraum von 24 Monaten (n=14). Die Mittelwerte hierzu sind für IP10 0,13 zu 3,66 ; der Median 0,03 zu 1,7 und der p Wert 0,014. Die Mittelwerte für MIG sind 0,1 zu 1,5 ; der Median 0,03 zu 1,25 und der p Wert 0,014. Die Mittelwerte für CXCR3 sind 0,15 zu 2,5 ; der Median 0,05 zu 1,47 und der p Wert 0,044.

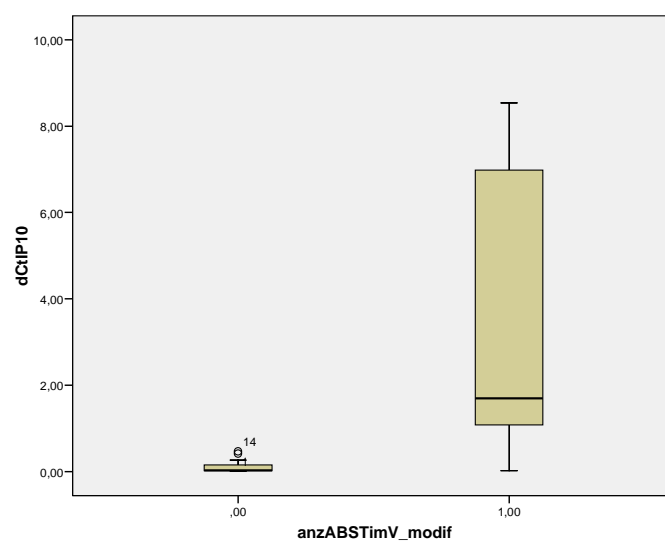


Abb.21 Boxplot für GE von IP10 für die Gruppe 0 mit höchstens einer Abstoßung und Gruppe 1 mit zwei oder mehr Abstoßungen im Beobachtungszeitraum.

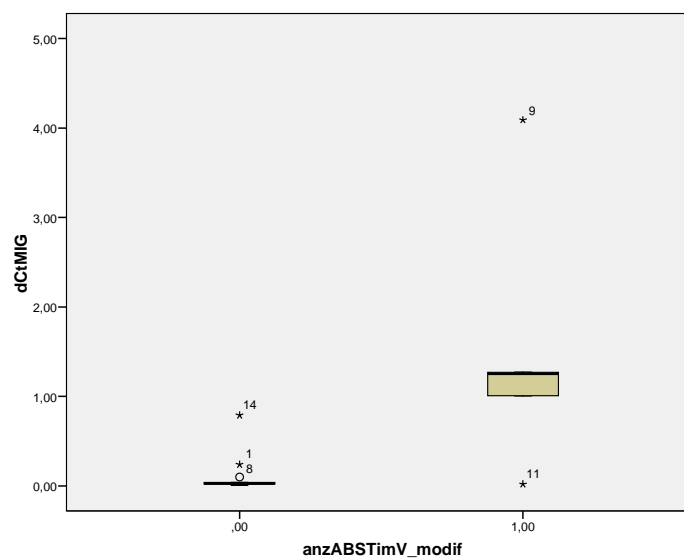


Abb.22 Boxplot für GE von MIG für die Gruppe 0 mit höchstens einer Abstoßung und Gruppe 1 mit zwei oder mehr Abstoßungen im Beobachtungszeitraum.

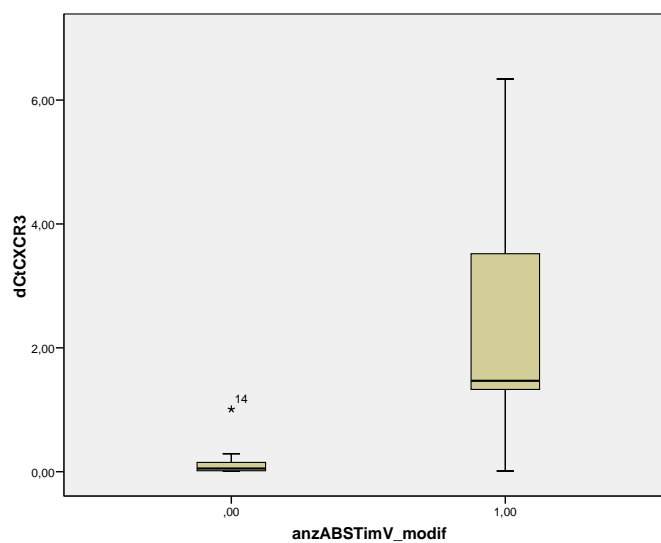


Abb.23 Boxplot für GE von CXCR3 für die Gruppe 0 mit höchstens einer Abstoßung und Gruppe 1 mit zwei oder mehr Abstoßungen im Beobachtungszeitraum.

In der Biopsie zum Zeitpunkt Eins zeigt sich, dass die Organe von CMV positiven Spendern (n=12) eine signifikant geringere IP10 Expression ( $p = 0,031$ ) als die der CMV negativen Spender (n=8) haben. Die Mittelwerte (Median) für IP10 sind 2,21 (0,37) zu 0,28 (0,02) und für MIG 0,49 (0,17) zu 0,45 (0,03) und für CXCR3 1,5 (0,16) zu 0,29 (0,06). Die p Werte für CXCR3 und MIG sind 0,188 und 0,243.

### 3.2.1.2 Biopsie zum Zeitpunkt **Zwei**

Die Biopsie zum Zeitpunkt Zwei erfolgte nach Reperfusion. Es wurden hier 20 Proben der Auswertung zugeführt.

Beim Vergleich der Gruppe mit mindestens mäßiger Abstoßung (n=8) und der Gruppe mit höchstens leichter Abstoßung (n=12), zeigt sich eine höhere Chemokinexpression bei schwerer Abstoßung. Für CXCR3 sind die Mittelwerte 6,2 zu 0,11 und der Median 0,54 zu 0,03. Die Mittelwerte für MIG sind 1,5 zu 0,1 und der Median 0,37 zu 0,02. Die Mittelwerte für IP10 sind 7,96 zu 0,133 und der Median 0,91 zu 0,04. Die Unterschiede sind mit einem p Werten von 0,047 für CXCR3 signifikant und für MIG und IP10 nicht signifikant.

Für die stufenweise Zunahme der histologischen Schwere der Abstoßungen ergibt sich tendenziell eine parallele Zunahme der Mittelwerte der Chemokinexpression, die aber nicht signifikant ist.

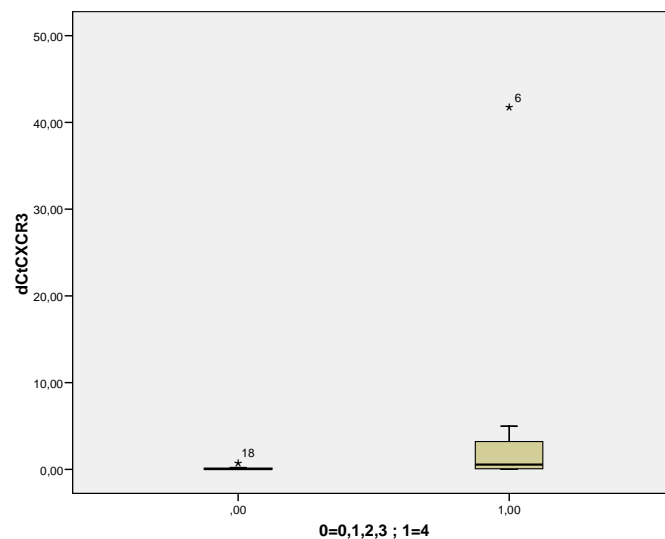


Abb.24 Boxplot für die GE von CXCR3 für die Gruppe 0 mit höchstens leichter Abstoßung (0-3) und Gruppe 1 mit mindestens mäßiger Abstoßung (4).

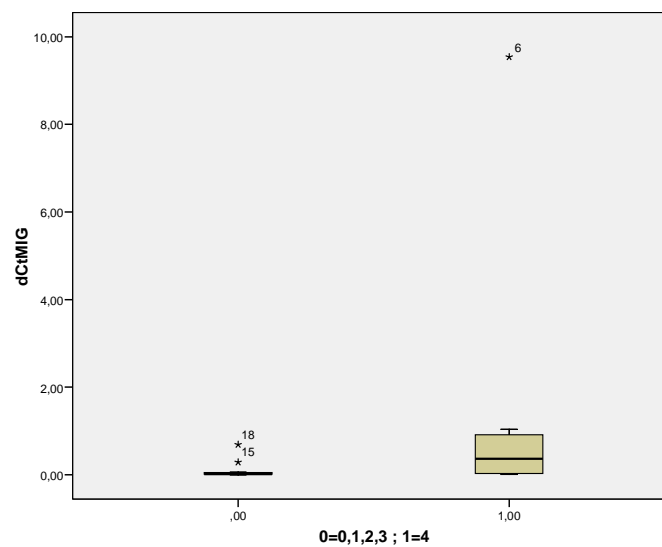


Abb.25 Boxplot für die GE von MIG für die Gruppe 0 mit höchstens leichter Abstoßung (0-3) und Gruppe 1 mit mindestens mäßiger Abstoßung (4).

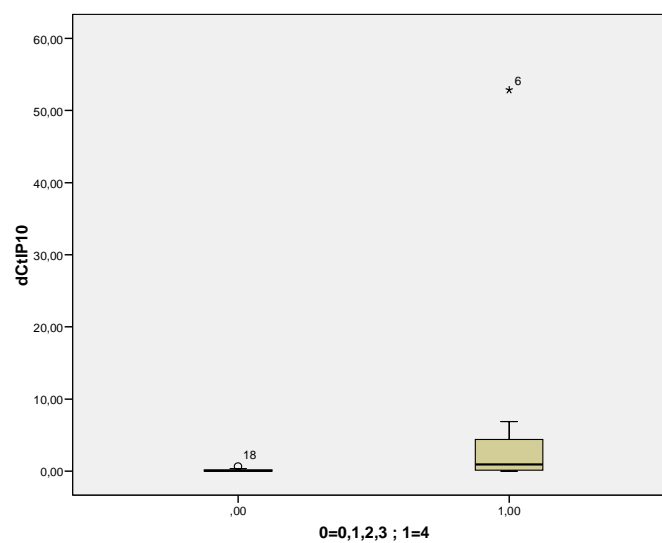


Abb.26 Boxplot für die GE von IP10 für die Gruppe 0 mit höchstens leichter Abstoßung (0-3) und Gruppe 1 mit mindestens mäßiger Abstoßung (4).

Vergleicht man die Gruppe ohne Abstoßung (n=5) mit der Gruppe mit Abstoßung (n=15), dann erhält man folgende Mittelwert bzw. Medianpaare. Für CXCR3 ist der Mittelwert 0,014 zu 3,37 und der Median 0,01 zu 0,16. Für MIG ist der Mittelwert 0,02 zu 0,88 und der Median 0,02 zu 0,04. Für IP10 ist der Mittelwert 0,03 zu 4,34

und der Median 0,02 zu 0,033. Die Unterschiede sind für CXCR3 mit  $p=0,008$  hoch signifikant und für IP10 mit  $p=0,033$  signifikant. Für MIG ist der Unterschied bei einem  $p$  Wert von 0,081 nicht signifikant.

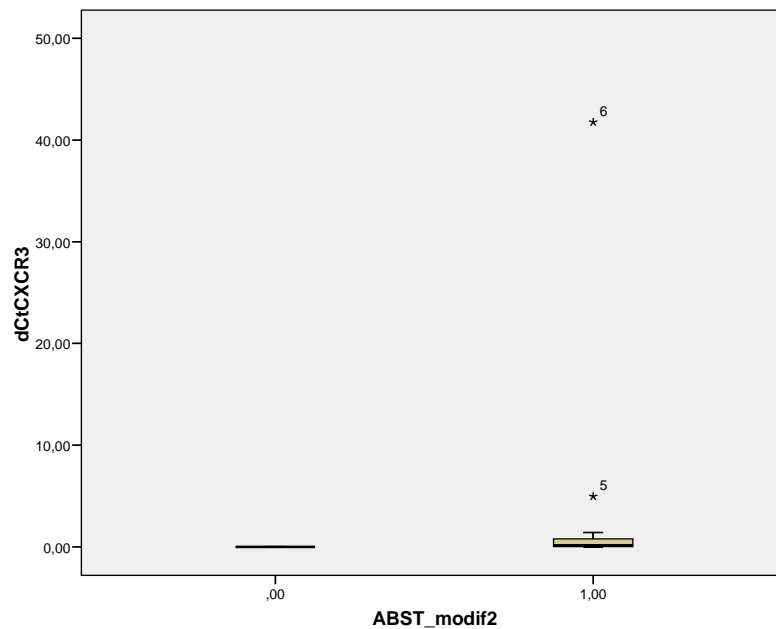


Abb.27 Boxplot der GE von CXCR3 für die Gruppe 0 ohne Abstoßung und der Gruppe 1 mit Abstoßung .

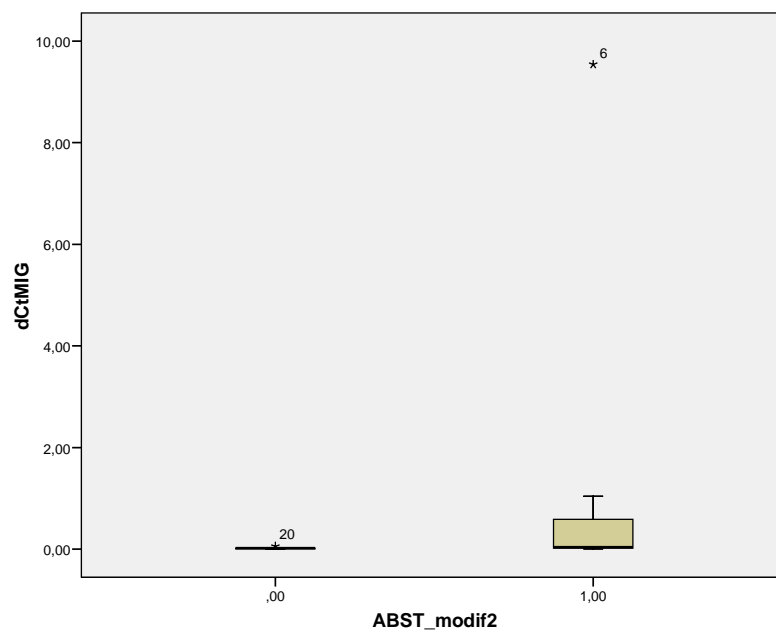


Abb.28 Boxplot der GE von MIG für die Gruppe 0 ohne Abstoßung und der Gruppe 1 mit Abstoßung.

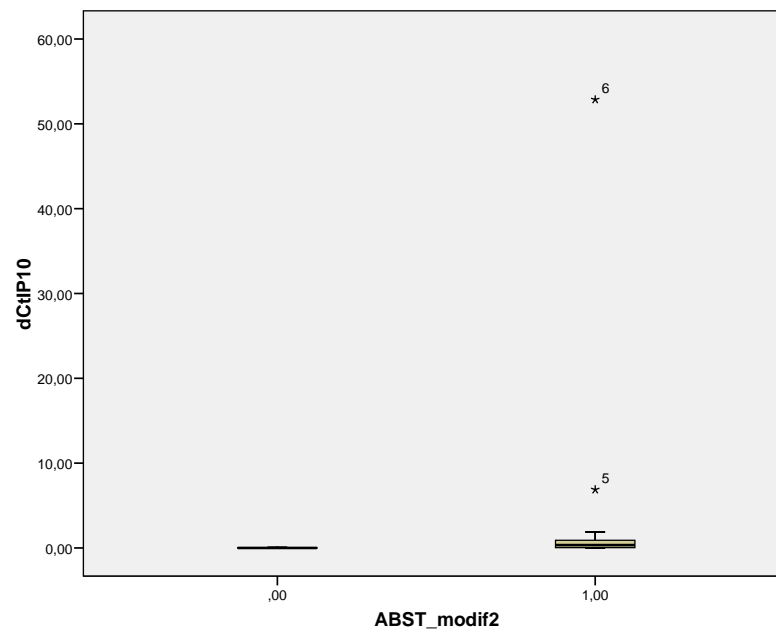


Abb.29 Boxplot der GE von IP10 für die Gruppe 0 ohne Abstoßung und der Gruppe 1 mit Abstoßung.

Bei der Bildung von zwei Gruppen, von denen die eine maximal eine Abstoßung ( $n=6$ ) und die andere mindestens zwei Abstoßungen ( $n=14$ ) im Beobachtungszeitraum hatte, erhält man keine signifikant unterschiedliche Chemokinexpressionen zwischen den Gruppen. Die Mittelwerte hierzu sind für IP10 0,7 zu 9,3 ; der Median 0,04 zu 0,5 und der p Wert 0,2. Die Mittelwerte für MIG sind 0,16 zu 1,85 ; der Median 0,02 zu 0,37 und der p Wert 0,27. Die Mittelwerte für CXCR3 sind 0,5 zu 7,4 ; der Median 0,035 zu 0,45 und der p Wert 0,13.

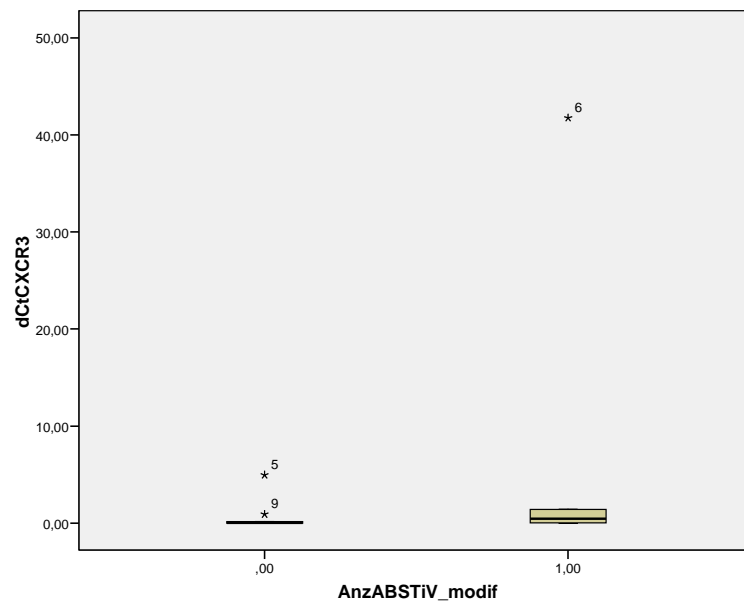


Abb.30 Boxplot der GE von CXCR3 für die Gruppe 0 mit höchstens einer und der Gruppe 1 mit mehr als einer Abstoßung im Beobachtungszeitraum.

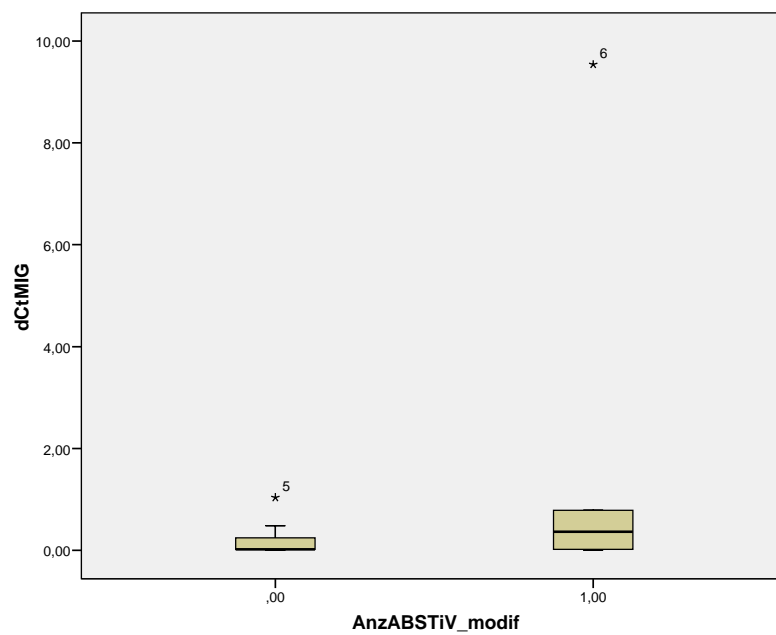


Abb.31 Boxplot der GE von MIG für die Gruppe 0 mit höchstens einer und der Gruppe 1 mit mehr als einer Abstoßung im Beobachtungszeitraum.



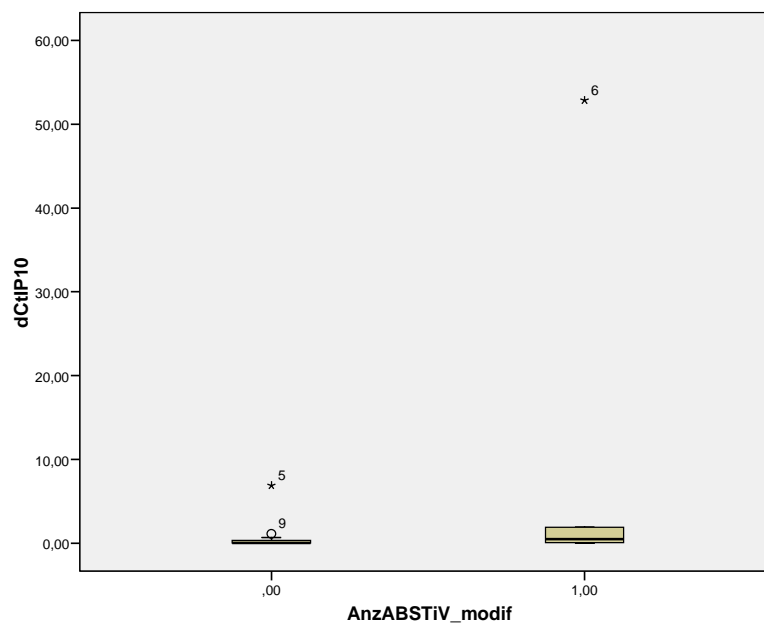


Abb.32 Boxplot der GE von IP10 für die Gruppe 0 mit höchstens einer und der Gruppe 1 mit mehr als einer Abstoßung im Beobachtungszeitraum.

### 3.2.1.3 Biopsie zum Zeitpunkt **Drei**

Für die Werte aus der Biopsie zum Zeitpunkt Drei ergeben sich folgende Werte. Es wurden hier 16 Proben gewonnen und der Auswertung zugeführt.

Die Mittelwerte der Gruppe (1) mit mindestens mäßiger Abstoßung (n=8) sind im Vergleich mit denen der Gruppe (0) mit höchstens leichter Abstoßung (n=8) nicht immer höher. Die Mittelwerte für CXCR3 sind 0,95 (Gruppe 1) zu 2,3 (Gruppe 0) und der Median 0,45 zu 0,19. Die Mittelwerte für MIG sind 3 zu 2,2 und der Median 0,5 zu 0,3. Die Mittelwerte für IP10 sind 2,6 zu 4,3 und der Median 1 zu 0,3. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

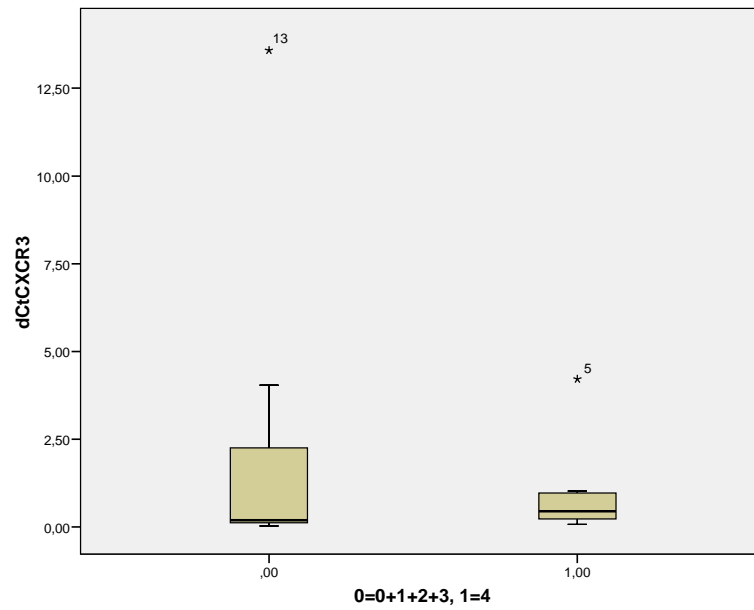


Abb. 33 Boxplot für die GE von CXCR3 für die Gruppe 0 mit höchstens leichter Abstoßung (0-3) und Gruppe 1 mit mindestens mäßiger Abstoßung (4).

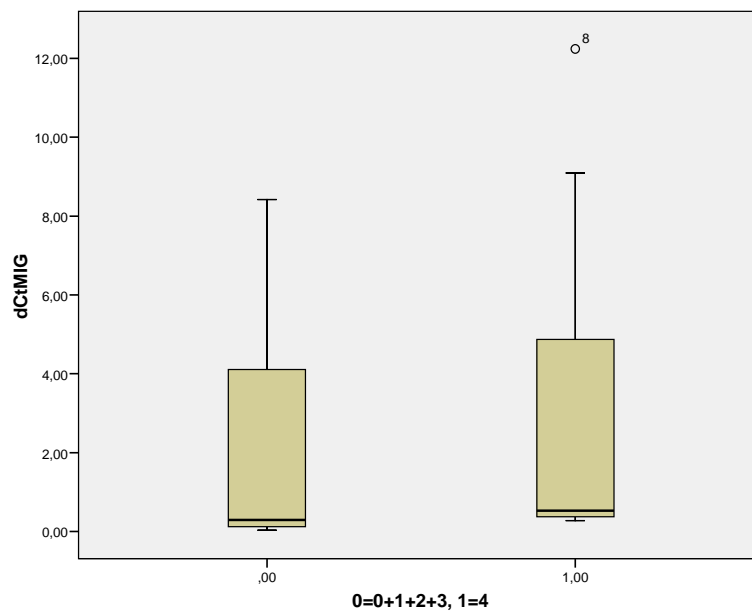


Abb. 34 Boxplot für die GE von MIG für die Gruppe 0 mit höchstens leichter Abstoßung (0-3) und Gruppe 1 mit mindestens mäßiger Abstoßung (4).

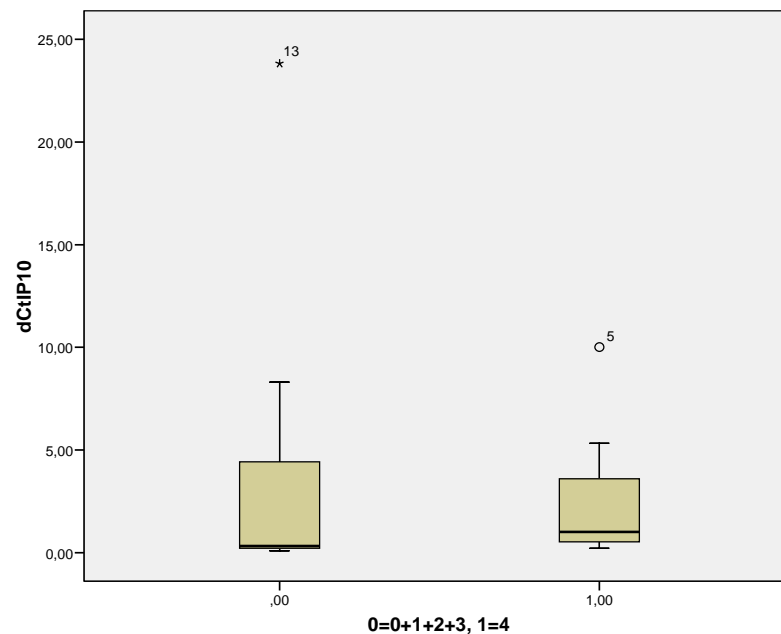


Abb. 35 Boxplot für die GE von IP10 für die Gruppe 0 mit höchstens leichter Abstoßung (0-3) und Gruppe 1 mit mindestens mäßiger Abstoßung (4).

Werden die Patienten 15 und 18 aufgrund sehr hoher Genexpression bei geringer histologischer Abstoßung als Ausreißer aus dem Kollektiv ausgeschlossen, erhält man einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte von MIG und IP10 für die beiden Gruppen, mit höherer Chemokinexpression für die Gruppe mit mindestens mäßiger Abstoßung. Die Mittelwerte und Mediane stellen sich wie folgt dar. Die Mittelwerte für CXCR3 sind 0,19 zu 0,95 und der Median 0,14 zu 0,45. Für MIG 0,21 zu 3 und 0,17 zu 0,52. Für IP10 0,29 zu 2,56 und 0,32 zu 1,01. Die p Werte sind CXCR3 = 0,142; MIG = 0,013; IP10 = 0,043.

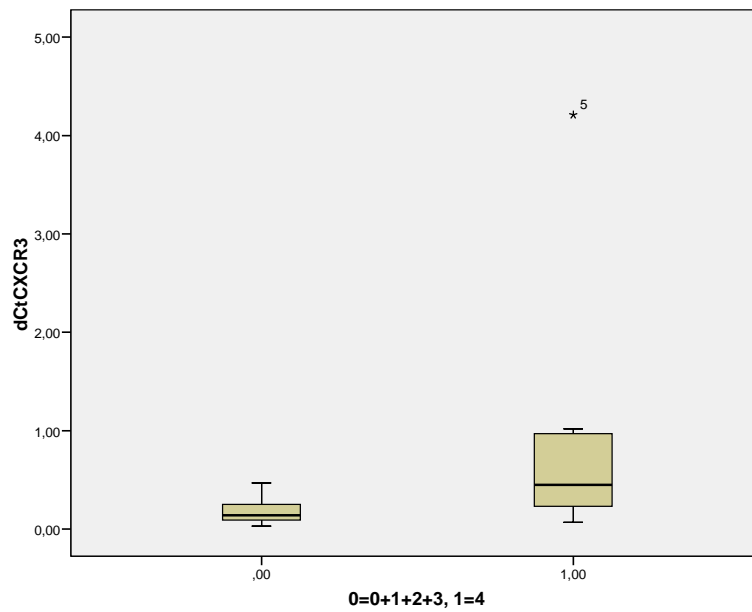


Abb. 36 Boxplot für die GE von CXCR3 OHNE Patienten Nr. 15 und Nr. 18 für die Gruppe 0 mit höchstens leichter Abstoßung (0-3) und Gruppe 1 mit mindestens mäßiger Abstoßung (4).

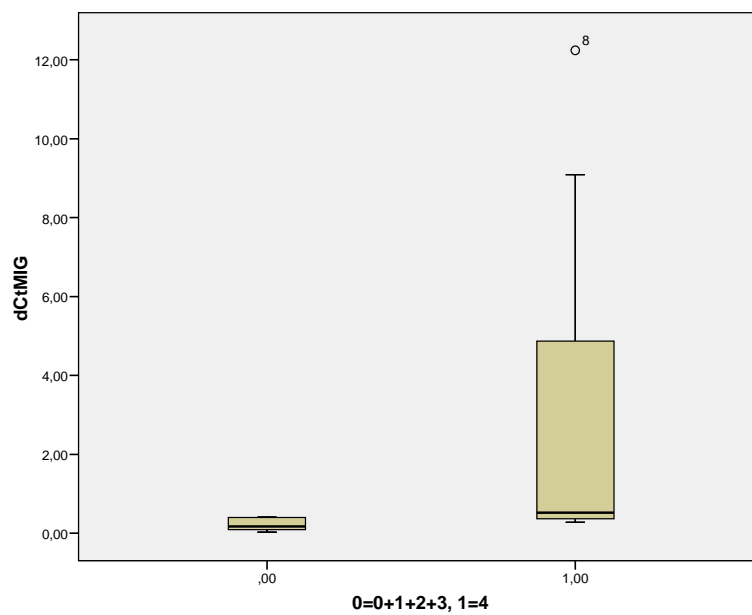


Abb. 37 Boxplot für die GE von MIG OHNE Patienten Nr. 15 und Nr. 18 für die Gruppe 0 mit höchstens leichter Abstoßung (0-3) und Gruppe 1 mit mindestens mäßiger Abstoßung (4).

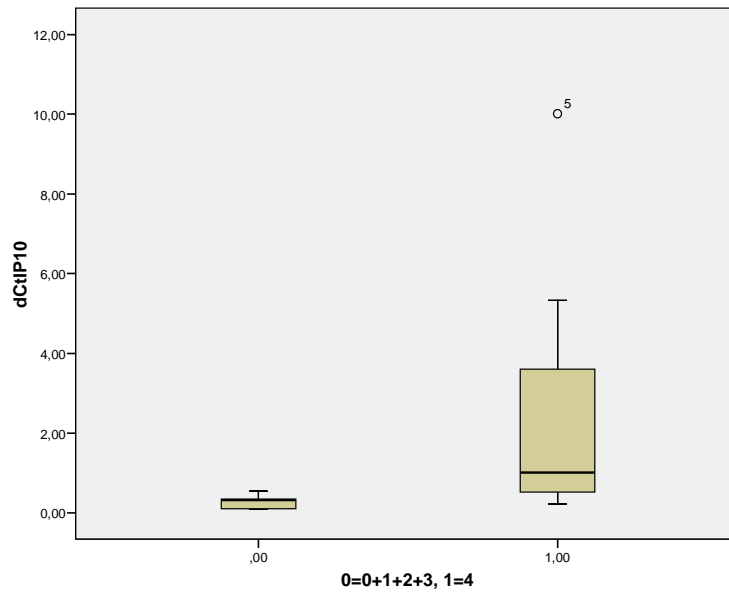


Abb. 38 Boxplot für die GE von IP10 OHNE Patienten Nr. 15 und Nr. 18 für die Gruppe 0 mit höchstens leichter Abstoßung (0-3) und Gruppe 1 mit mindestens mäßiger Abstoßung (4).

Für die stufenweise Zunahme der histologischen Schwere der Abstoßungen ergibt sich tendenziell eine parallele Zunahme der Mittelwerte der Chemokinexpression, die für MIG (p Wert = 0,048) und IP10 (p Wert = 0,044) signifikant ist.

Vergleicht man die Gruppe, die histologisch keine nachgewiesene Abstoßung entwickelt hat (n=2) mit der Gruppe, die dies hat (n=14), dann erhält man folgende Werte: für CXCR3 ist der Mittelwert 0,08 zu 1,87 und der Median 0,08 zu 0,44 . Für MIG ist der Mittelwert 0,17 zu 2,94 und der Median 0,17 zu 0,47. Für IP10 ist der Mittelwert 0,2 zu 3,8 und der Median 0,2 zu 0,8. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

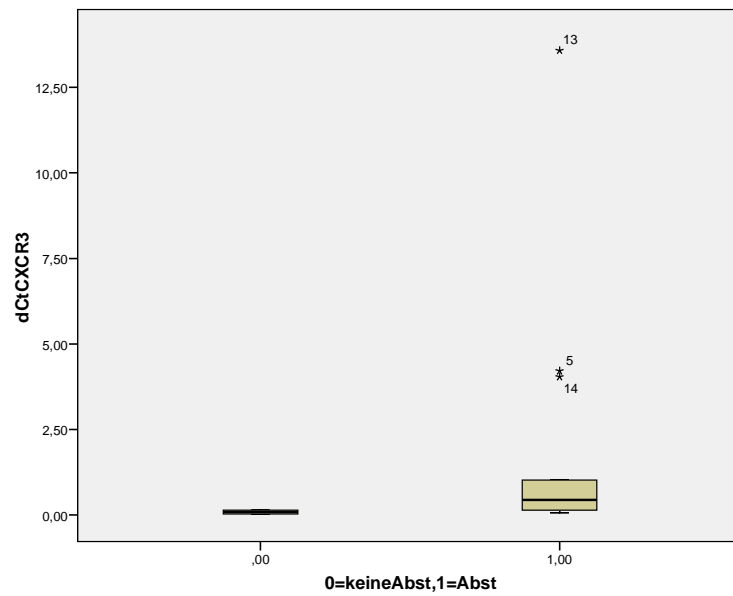


Abb. 39 Boxplot der GE von CXCR3 für die Gruppe 0 ohne Abstoßung und der Gruppe 1 mit Abstoßung .

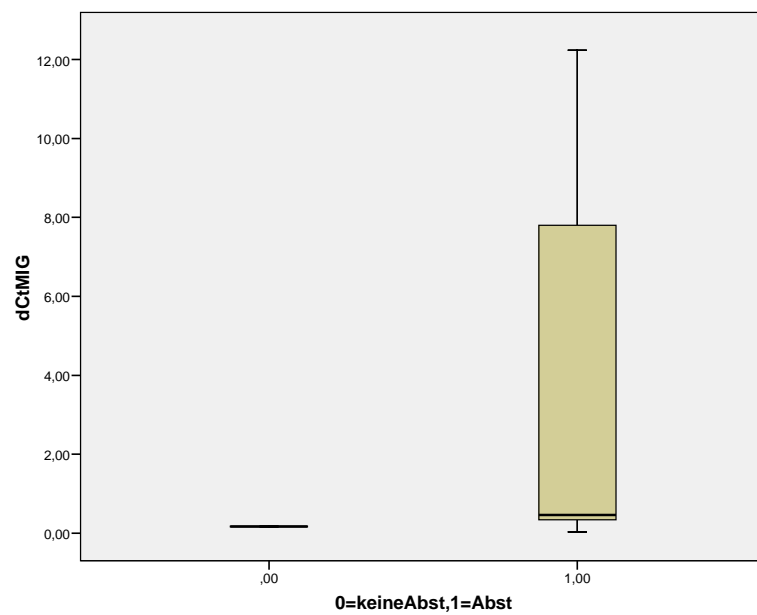


Abb. 40 Boxplot der GE von MIG für die Gruppe 0 ohne Abstoßung und der Gruppe 1 mit Abstoßung.

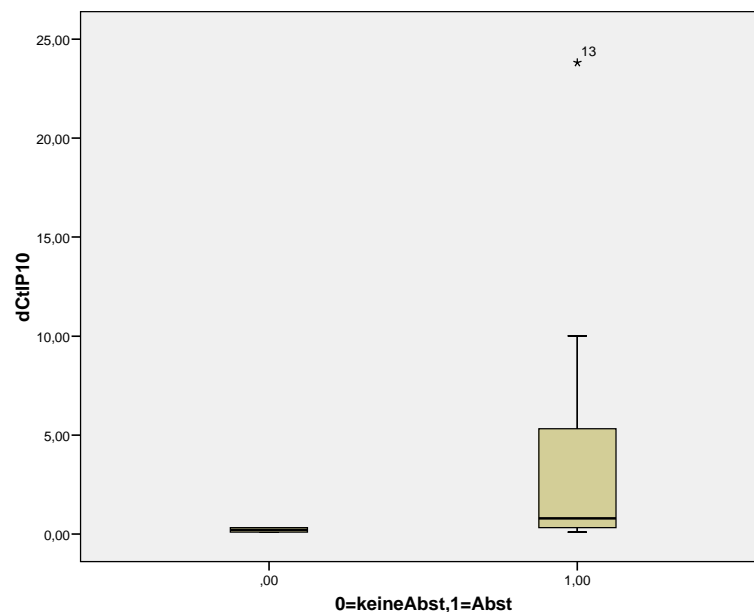


Abb. 41 Boxplot der GE von CXCR3 für die Gruppe 0 ohne Abstoßung und der Gruppe 1 mit Abstoßung.

Patienten, die mehr als eine Abstoßung im Beobachtungszeitraum von 24 Monaten hatten (n=10), zeigten eine Tendenz zu höheren Chemokinwerten als Patienten, die maximal eine Abstoßung hatten (n=6). Diese Tendenz ist nicht signifikant zum Zeitpunkt Drei. Die Mittelwerte hierzu sind für IP10 2,9 zu 4,2; der Median 0,43 zu 3,3 und der p Wert 0,263. Die Mittelwerte für MIG sind 1,1 zu 5,1; der Median 0,4 zu 4,42 und der p Wert 0,313. Die Mittelwerte für CXCR3 sind 1,62 zu 1,68; der Median 0,265 zu 0,75 und der p Wert 0,181.

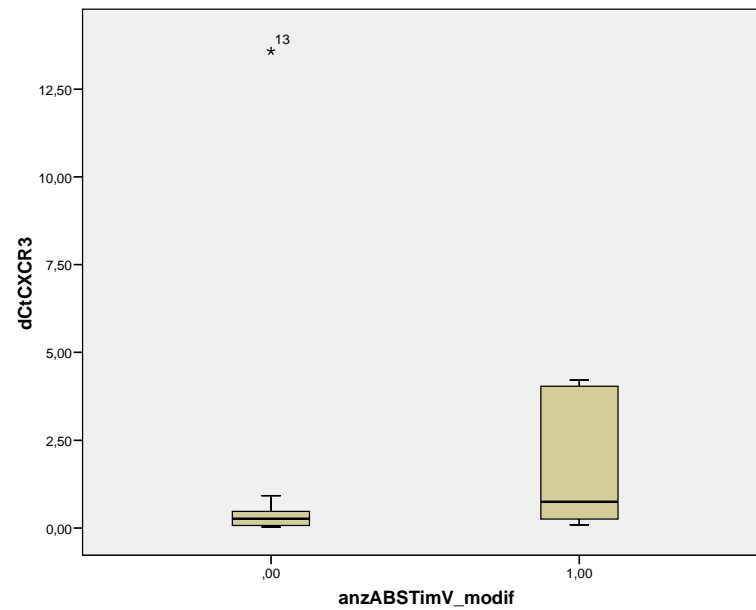


Abb. 42 Boxplot der GE von CXCR3 für die Gruppe 0 mit höchstens einer und der Gruppe 1 mit mehr als einer Abstoßung im Beobachtungszeitraum.

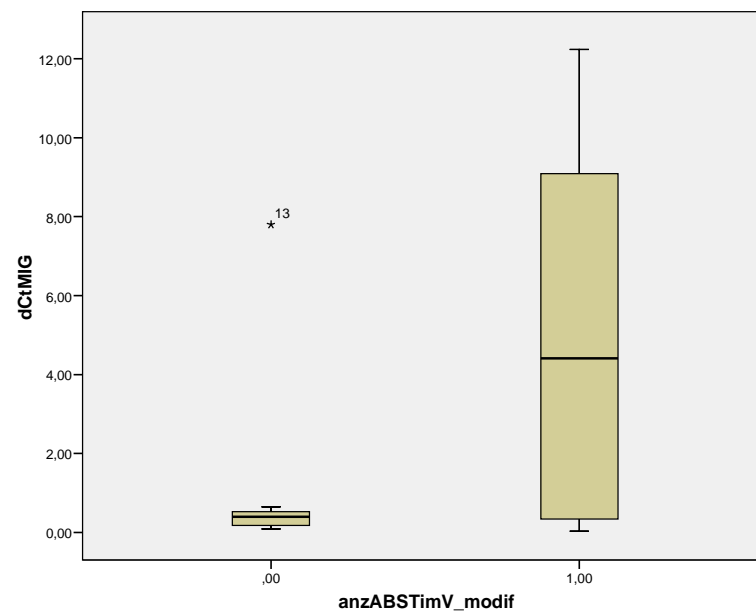


Abb. 43 Boxplot der GE von MIG für die Gruppe 0 mit höchstens einer und der Gruppe 1 mit mehr als einer Abstoßung im Beobachtungszeitraum.



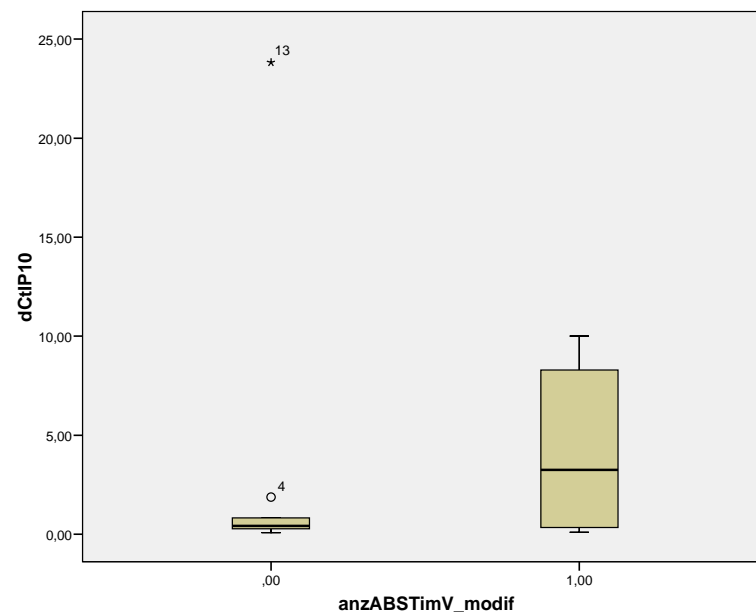


Abb. 44 Boxplot der GE von IP10 für die Gruppe 0 mit höchstens einer und der Gruppe 1 mit mehr als einer Abstoßung im Beobachtungszeitraum.

#### 3.2.1.4 Biopsate zu allen Zeitpunkten

Bei der gemeinsamen Auswertung aller gewonnen Proben (n=55) zeigt sich eine höhere Chemokinexpression bei Proben aus Biopsaten mit histologisch nachgewiesener Abstoßung (n=14) als bei Proben ohne (n=41). Diese Unterschiede sind hoch signifikant mit einem p Wert von 0,008 für CXCR3, und  $p = 0,001$  für MIG und  $p = 0,002$  für IP10. Die Mittelwerte für CXCR3 sind 1,6 zu 1,87 und der Median 0,07 zu 0,45. Die Mittelwerte für MIG sind 0,55 zu 2,94 und der Median 0,04 zu 0,47. Die Mittelwerte für IP10 sind 2,09 zu 3,85 und der Median 0,09 zu 0,8. Auch beim Vergleich der Proben aus Biopsaten mit einer mindestens mäßigen Abstoßung (n=8) zu Proben aus Biopsaten mit geringeren oder keinen Abstoßungen (n=47) zeigen sich signifikant höhere Expressionen von MIG (p Wert = 0,006) und IP10 (p Wert = 0,011) in der Gruppe mit mindestens mäßigen Abstoßungen. CXCR3 ist hier mit  $p = 0,075$  nicht signifikant.

Für die stufenweise Zunahme der histologischen Schwere der Abstoßungen zeigt sich eine parallele Zunahme der Mittelwerte der Chemokinexpression, wenn man alle Proben betrachtet. Diese Zunahme ist signifikant für CXCR3, MIG und IP10. Die p Werte sind CXCR3 = 0,026, MIG = 0,04, IP10 = 0,05.

Die Betrachtung aller Biopsate zeigt, dass die Biopsate der Patienten, die mehr als eine Abstoßung im Beobachtungszeitraum von 24 Monaten entwickelt haben (n=17), eine signifikant höhere Chemokinexpression aufweisen, als die der Patienten, die höchstens eine Abstoßung entwickelt haben (n=38). Der p Wert für CXCR3 ist 0,002. für MIG 0,002 und für IP10 0,002. Die Mittelwerte (Median) für CXCR3 sind 0,65 (0,07) - 3,93 (1,02) für MIG 0,39 (0,04) - 2,9 (0,15) und für IP10 1,06 (0,15) - 5,85 (1,2).

### 3.2.2 Untersuchung der prognostischen Aussagekraft der Genexpression

Folgend ist eine Genexpression durch einen delta Ct Wert von  $\geq 0,2$  für das entsprechende Zielgen definiert.

43,1 % aller Biopsate zeigten für CXR3 eine Genexpression, 48,3% für MIG und 56,9% für IP10. Die Genexpressionen sind in Tabelle 4 aufgeteilt nach den einzelnen Zeitpunkten aufgeführt.

|           | CXCR3  | MIG | IP10   |
|-----------|--------|-----|--------|
| Biopsie 1 | 35%    | 40% | 45%    |
| Biopsie 2 | 30%    | 40% | 45%    |
| Biopsie 3 | 62,50% | 75% | 81,25% |

Tabelle 4 Genexpression in Prozent der Gesamtbiopsate (n=58)

Betrachtet man die Genexpression aller 58 untersuchten Leberbiopsate und unterteilt sie in Genexpression ja oder nein und in Abstoßung ja oder nein, erhält man einen signifikanten Zusammenhang zwischen Genexpression und Abstoßung für alle drei Zielgene. Betrachtet man die Ergebnisse der Genexpression der Zielgene getrennt für jeden Zeitpunkt und in Bezug auf eine vorhandene oder nicht vorhandene Abstoßung zum Zeitpunkt Drei findet man im exakten Test nach Fisher einen signifikanten Zusammenhang für MIG zu jedem Zeitpunkt für IP10 zum Zeitpunkt Eins und Zwei jedoch zu keinem Zeitpunkt für CXCR3. Diese Ergebnisse sind in folgender Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5 Vierfeldertafeln für die Zielgene mit Risikofaktor Genexpression (GE) und Ereignis Abstoßung (Abst.) mit Sensivität, Spezifität, Odds Ratio (OR), Relatives Risiko (RR), negativ (NPW) und positiv prädiktiver Wert (PPW), sowie Signifikanzprüfung mittels exakter Test nach Fisher. Die Genexpression ist definiert durch eine Zielgenexpression von  $\geq 0,2$ .

| <b>MIG alle Bx</b>                        | <b>keine Abst</b> | <b>Abst</b> | <b>Summe</b>   |
|---|-------------------|-------------|----------------|
| <b>GE</b>                                 | 16                | 12          | 28             |
| <b>keine GE</b>                           | 28                | 2           | 30             |
| <b>Summe</b>                              | 44                | 14          | 58             |
| <b>Exakter Test nach Fischer p Wert =</b> |                   |             | <b>0,00176</b> |

| <b>MIG Bx1</b>                            | <b>keine Abst</b> | <b>Abst</b> | <b>Summe</b>  |
|---|-------------------|-------------|---------------|
| <b>GE</b>                                 | 0                 | 8           | 8             |
| <b>keine GE</b>                           | 6                 | 6           | 12            |
| <b>Summe</b>                              | 6                 | 14          | 20            |
| <b>Exakter Test nach Fischer p Wert =</b> |                   |             | <b>0,0419</b> |

| <b>Statistik</b>    | <b>Wert</b> | <b>95% KI unten</b> | <b>95% KI oben</b> |
|---------------------|-------------|---------------------|--------------------|
| <b>Sensivität :</b> | 85,71%      | 59,70%              | 97,43%             |
| <b>Spezifität :</b> | 63,64%      | 55,36%              | 67,36%             |
| <b>OR :</b>         | 10,5        | 1,84                | 78,12              |
| <b>RR :</b>         | 6,43        | 1,59                | 40,55              |
| <b>PPW :</b>        | 0,43        | 0,3                 | 0,49               |
| <b>NPW :</b>        | 0,93        | 0,81                | 0,99               |

| <b>Statistik</b>    | <b>Wert</b> | <b>95% KI unten</b> | <b>95% KI oben</b> |
|---------------------|-------------|---------------------|--------------------|
| <b>Sensivität :</b> | 56,67%      | 39,70%              | 56,70%             |
| <b>Spezifität :</b> | 99,24%      | 60,36%              | 99,90%             |
| <b>OR :</b>         | 170         | 1                   | 11109              |
| <b>RR :</b>         | 1,99        | 1                   | 2,02               |
| <b>PPW :</b>        | 0,99        | 0,7                 | 0,99               |
| <b>NPW :</b>        | 0,5         | 0,3                 | 0,5                |

| <b>MIG Bx2</b>                            | <b>keine Abst</b> | <b>Abst</b> | <b>Summe</b>  |
|---|-------------------|-------------|---------------|
| <b>GE</b>                                 | 0                 | 8           | 8             |
| <b>keine GE</b>                           | 6                 | 6           | 12            |
| <b>Summe</b>                              | 6                 | 14          | 20            |
| <b>Exakter Test nach Fischer p Wert =</b> |                   |             | <b>0,0419</b> |

| <b>MIG Bx3</b>                            | <b>keine Abst</b> | <b>Abst</b> | <b>Summe</b> |
|---|-------------------|-------------|--------------|
| <b>GE</b>                                 | 0                 | 12          | 12           |
| <b>keine GE</b>                           | 2                 | 2           | 4            |
| <b>Summe</b>                              | 2                 | 14          | 16           |
| <b>Exakter Test nach Fischer p Wert =</b> |                   |             | <b>0,05</b>  |

| <b>Statistik</b>    | <b>Wert</b> | <b>95% KI unten</b> | <b>95% KI oben</b> |
|---------------------|-------------|---------------------|--------------------|
| <b>Sensivität :</b> | 56,67%      | 39,69%              | 56,99%             |
| <b>Spezifität :</b> | 99,24%      | 60,36%              | 99,99%             |
| <b>OR :</b>         | 170         | 1,002               | 11109,99           |
| <b>RR :</b>         | 1,99        | 1,001               | 2,02               |
| <b>PPW :</b>        | 0,99        | 0,7                 | 0,99               |
| <b>NPW :</b>        | 0,5         | 0,3                 | 0,5                |

| <b>Statistik</b>    | <b>Wert</b> | <b>95% KI unten</b> | <b>95% KI oben</b> |
|---------------------|-------------|---------------------|--------------------|
| <b>Sensivität :</b> | 83,33%      | 71,40%              | 83,66%             |
| <b>Spezifität :</b> | 98,04%      | 27,65%              | 99,97%             |
| <b>OR :</b>         | 250         | 0,95                | 16708,18           |
| <b>RR :</b>         | 1,99        | 0,99                | 2,04               |
| <b>PPW :</b>        | 0,99        | 0,85                | 0,99               |
| <b>NPW :</b>        | 0,5         | 0,14                | 0,51               |

| <b>IP10 alle Bx</b>                       | <b>keine Abst</b> | <b>Abst</b> | <b>Summe</b>   |
|---|-------------------|-------------|----------------|
| <b>GE</b>                                 | 20                | 13          | 33             |
| <b>keine GE</b>                           | 24                | 1           | 25             |
| <b>Summe</b>                              | 44                | 14          | 58             |
| <b>Exakter Test nach Fischer p Wert =</b> |                   |             | <b>0,00178</b> |

| <b>IP10 Bx1</b>                           | <b>keine Abst</b> | <b>Abst</b> | <b>Summe</b>  |
|---|-------------------|-------------|---------------|
| <b>GE</b>                                 | 0                 | 9           | 9             |
| <b>keine GE</b>                           | 6                 | 5           | 11            |
| <b>Summe</b>                              | 6                 | 14          | 20            |
| <b>Exakter Test nach Fischer p Wert =</b> |                   |             | <b>0,0141</b> |

| <b>Statistik</b>    | <b>Wert</b> | <b>95% KI unten</b> | <b>95% KI oben</b> |
|---------------------|-------------|---------------------|--------------------|
| <b>Sensivität :</b> | 99,00%      | 67,63%              | 99,63%             |
| <b>Spezifität :</b> | 54,54%      | 46,52%              | 56,70%             |
| <b>OR :</b>         | 15,6        | 1,82                | 352,9              |
| <b>RR :</b>         | 9,85        | 1,58                | 204,16             |
| <b>PPW :</b>        | 0,39        | 0,29                | 0,42               |
| <b>NPW :</b>        | 0,96        | 0,82                | 0,99               |

| <b>Statistik</b>    | <b>Wert</b> | <b>95% KI unten</b> | <b>95% KI oben</b> |
|---------------------|-------------|---------------------|--------------------|
| <b>Sensivität :</b> | 63,33%      | 46,23%              | 63,66%             |
| <b>Spezifität :</b> | 99,24%      | 60,16%              | 99,99%             |
| <b>OR :</b>         | 224,55      | 1,3                 | 14686,17           |
| <b>RR :</b>         | 2,17        | 1,082               | 2,2                |
| <b>PPW :</b>        | 0,995       | 0,73                | 0,99               |
| <b>NPW :</b>        | 0,54        | 0,33                | 0,55               |

| <a href="#">IP10 Bx2</a>           | keine Abst | Abst | Summe  |
|------------------------------------|------------|------|--------|
| GE                                 | 0          | 9    | 9      |
| keine GE                           | 6          | 5    | 11     |
| Summe                              | 6          | 14   | 520    |
| Exakter Test nach Fischer p Wert = |            |      | 0,0141 |

| Statistik    | Wert   | 95% KI unten | 95% KI oben |
|--------------|--------|--------------|-------------|
| Sensivität : | 63,33% | 46,23%       | 63,66%      |
| Spezifität : | 99,24% | 60,16%       | 99,99%      |
| OR :         | 224,55 | 1,3          | 14686,17    |
| RR :         | 2,17   | 1,082        | 2,2         |
| PPW :        | 0,995  | 0,73         | 0,99        |
| NPW :        | 0,54   | 0,33         | 0,55        |

| <a href="#">IP10 Bx3</a>           | keine Abst | Abst | Summe   |
|------------------------------------|------------|------|---------|
| GE                                 | 1          | 13   | 14      |
| keine GE                           | 1          | 1    | 2       |
| Summe                              | 2          | 14   | 16      |
| Exakter Test nach Fischer p Wert = |            |      | 0,24167 |

| Statistik    | Wert   | 95% KI unten | 95% KI oben |
|--------------|--------|--------------|-------------|
| Sensivität : | 92,86% | 86,11%       | 99,35%      |
| Spezifität : | 50,00% | 2,78%        | 95,50%      |
| OR :         | 13     | 0,18         | 3219,45     |
| RR :         | 1,86   | 0,89         | 21,88       |
| PPW :        | 0,93   | 0,86         | 0,99        |
| NPW :        | 0,5    | 0,03         | 0,95        |

| <a href="#">CXCR3 alle Bx</a>      | keine Abst | Abst | Summe   |
|------------------------------------|------------|------|---------|
| GE                                 | 15         | 10   | 25      |
| keine GE                           | 29         | 4    | 33      |
| Summe                              | 44         | 14   | 58      |
| Exakter Test nach Fischer p Wert = |            |      | 0,02786 |

| Statistik    | Wert   | 95% KI unten | 95% KI oben |
|--------------|--------|--------------|-------------|
| Sensivität : | 71,43% | 45,20%       | 89,81%      |
| Spezifität : | 65,91% | 57,56%       | 71,76%      |
| OR :         | 4,83   | 1,12         | 22,39       |
| RR :         | 3,3    | 1,089        | 11,63       |
| PPW :        | 0,4    | 0,25         | 0,52        |
| NPW :        | 0,88   | 0,77         | 0,96        |

| <a href="#">CXCR3 Bx1</a>          | keine Abst | Abst | Summe  |
|------------------------------------|------------|------|--------|
| GE                                 | 0          | 7    | 7      |
| keine GE                           | 6          | 7    | 13     |
| Summe                              | 6          | 14   | 20     |
| Exakter Test nach Fischer p Wert = |            |      | 0,0515 |

| Statistik    | Wert   | 95% KI unten | 95% KI oben |
|--------------|--------|--------------|-------------|
| Sensivität : | 50,00% | 33,20%       | 50,33%      |
| Spezifität : | 99,24% | 60,75%       | 99,98%      |
| OR :         | 130    | 0,77         | 8493,75     |
| RR :         | 1,85   | 0,92         | 1,88        |
| PPW :        | 0,99   | 0,66         | 0,99        |
| NPW :        | 0,46   | 0,28         | 0,47        |

| <a href="#">CXCR3 Bx2</a>          | keine Abst | Abst | Summe   |
|------------------------------------|------------|------|---------|
| GE                                 | 0          | 6    | 6       |
| keine GE                           | 6          | 8    | 14      |
| Summe                              | 6          | 14   | 20      |
| Exakter Test nach Fischer p Wert = |            |      | 0,11489 |

| Statistik    | Wert   | 95% KI unten | 95% KI oben |
|--------------|--------|--------------|-------------|
| Sensivität : | 43,33% | 26,84%       | 43,66%      |
| Spezifität : | 99,24% | 61,45%       | 99,00%      |
| OR :         | 99,41  | 0,58         | 6496,69     |
| RR :         | 1,75   | 0,84         | 1,77        |
| PPW :        | 0,99   | 0,615        | 0,99        |
| NPW :        | 0,433  | 0,27         | 0,44        |

| <a href="#">CXCR3 Bx3</a>          | keine Abst | Abst | Summe |
|------------------------------------|------------|------|-------|
| GE                                 | 0          | 10   | 10    |
| keine GE                           | 2          | 4    | 6     |
| Summe                              | 2          | 14   | 16    |
| Exakter Test nach Fischer p Wert = |            |      | 0,125 |

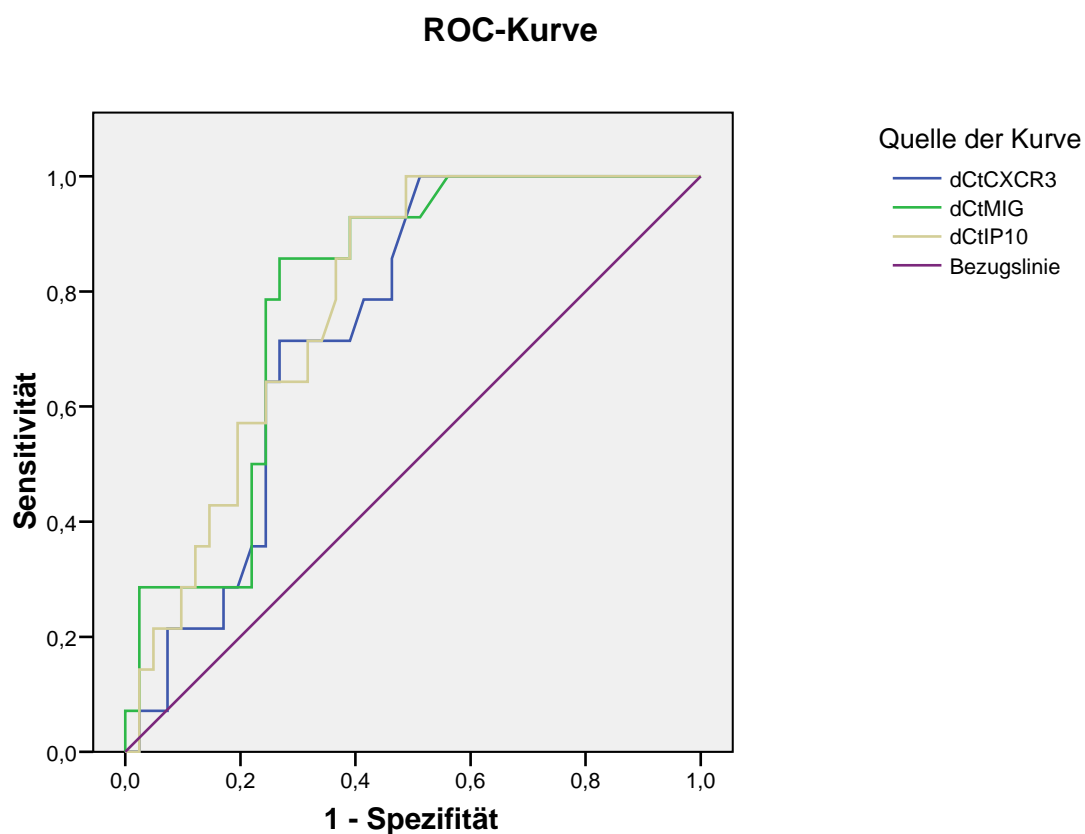
| Statistik    | Wert   | 95% KI unten | 95% KI oben |
|--------------|--------|--------------|-------------|
| Sensivität : | 70,00% | 57,96%       | 70,33%      |
| Spezifität : | 98,04% | 27,21%       | 99,97%      |
| OR :         | 116,67 | 0,52         | 7733,95     |
| RR :         | 1,55   | 0,91         | 1,57        |
| PPW :        | 0,99   | 0,82         | 0,99        |
| NPW :        | 0,36   | 0,09         | 0,36        |

### 3.2.3 ROC Kurven

Zur weiteren Beurteilung der Validität und Aussagekraft der Zielgene als diagnostische Marker wurden ROC Kurven erstellt. Eine Fläche unter der Kurve von Eins würde einen perfekten Marker wiedergeben. Eine Fläche von 0,7-0,9 spiegelt eine moderate Akkuranz wider und Werte von 0,5-0,7 eine niedrige (106).

Die entsprechenden ROC Kurven sehen wie folgt aus.

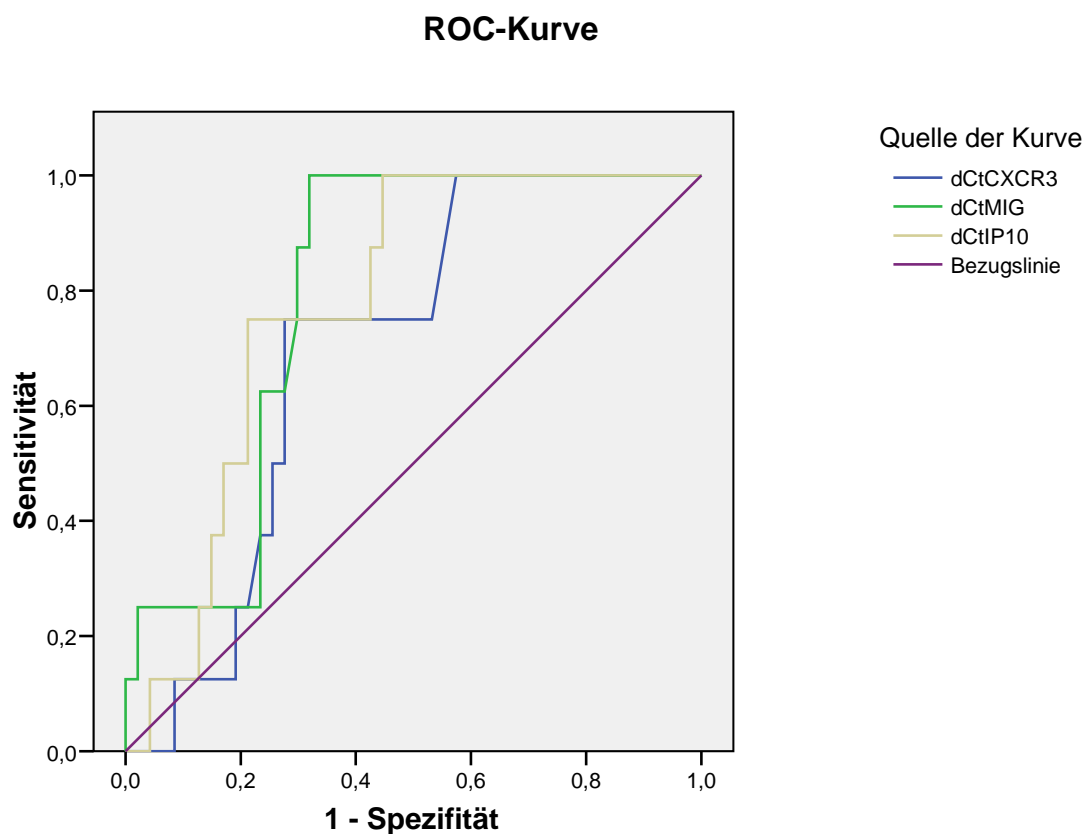
Abb. 45 ROC Kurve für alle Biopsate mit (n=14) oder ohne Abstoßung (n=41)



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen

| Variable(n) für Testergebnis | Fläche      | Standardfehler(a) | Asymptotische Signifikanz(b) | Asymptotisches 95% Konfidenzintervall |             |
|------------------------------|-------------|-------------------|------------------------------|---------------------------------------|-------------|
|                              | Untergrenze | Obergrenze        | Untergrenze                  | Obergrenze                            | Untergrenze |
| dCt-CXCR3                    | ,740        | ,066              | ,008                         | ,611                                  | ,870        |
| dCt-MIG                      | ,793        | ,061              | ,001                         | ,673                                  | ,913        |
| dCt-IP10                     | ,785        | ,061              | ,002                         | ,666                                  | ,904        |

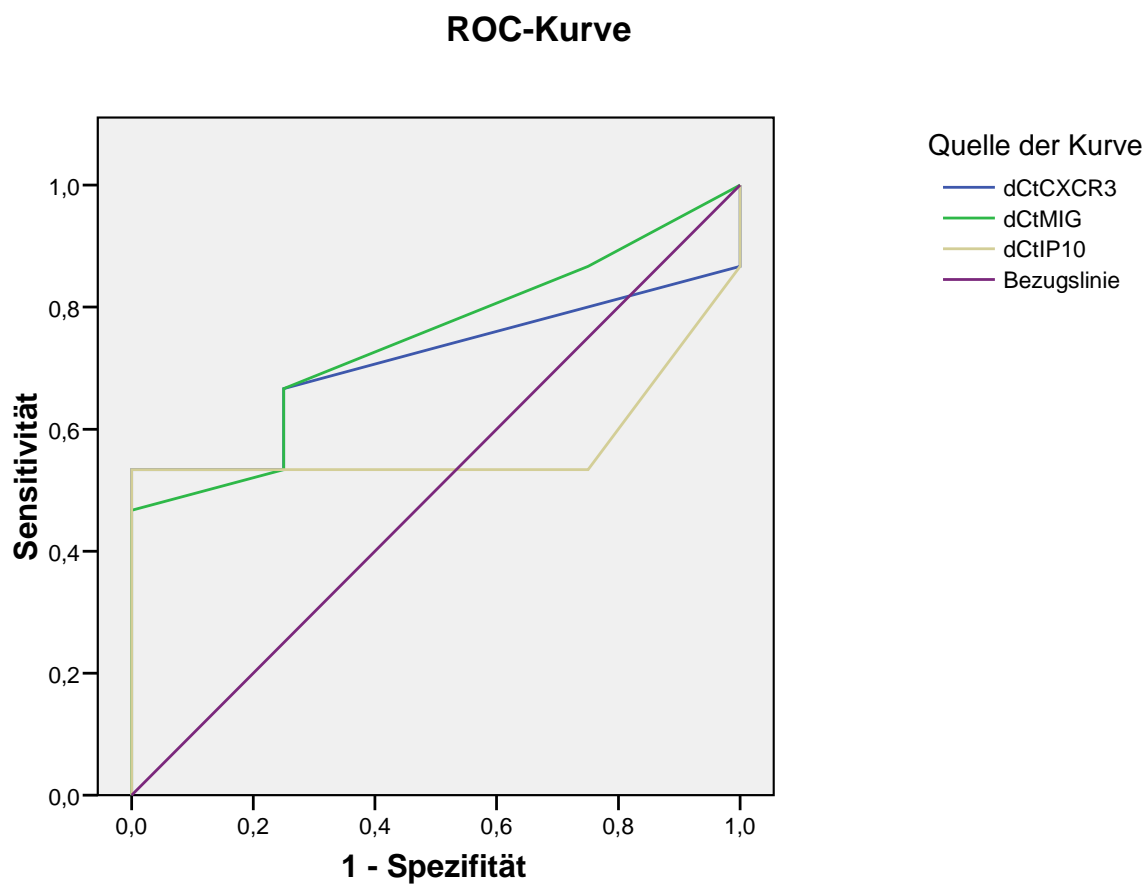
Abb.46 ROC Kurve für Chemokinexpression mit mindestens mäßiger Abstoßung (n=8) versus Abstoßung geringer als mäßig oder gar nicht (n=47) als Kriterium sieht wie folgt aus.



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

| Variable(n) für<br>Testergebnis | Fläche      | Standard-<br>fehler(a) | Asymptotische<br>Signifikanz(b) | Asymptotisches 95% Konfiden-<br>zintervall |             |
|---------------------------------|-------------|------------------------|---------------------------------|--|-------------|
|                                 | Untergrenze | Obergrenze             | Untergrenze                     | Obergrenze                                 | Untergrenze |
| dCt-CXCR3                       | ,698        | ,077                   | ,075                            | ,547                                       | ,849        |
| dCt-MIG                         | ,797        | ,063                   | ,008                            | ,673                                       | ,920        |
| dCt-IP10                        | ,777        | ,067                   | ,013                            | ,645                                       | ,908        |

Abb. 47 ROC Kurven der Chemokinexpression in der Biopsie zum Zeitpunkt eins mit Abstoßung ja (n=15) oder nein (n=4)

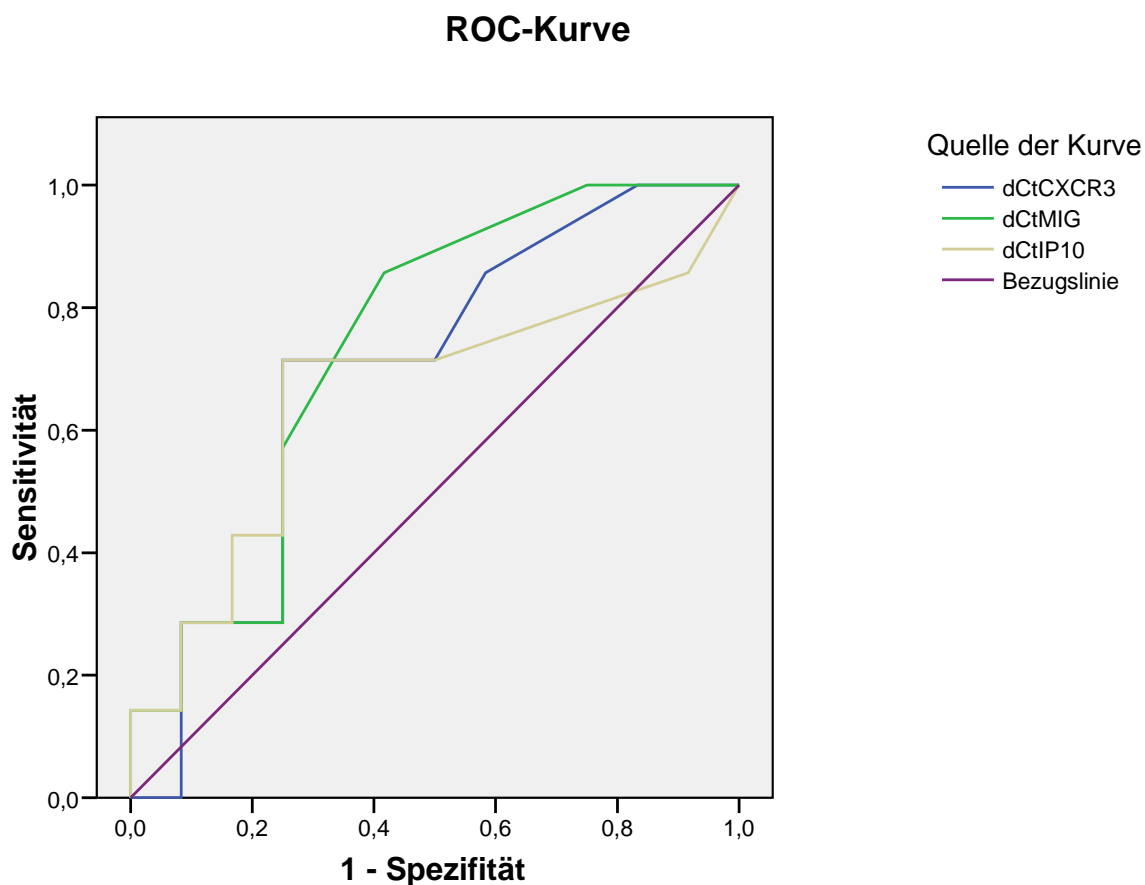


Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

| Variable(n) für Testergebnis | Fläche | Standardfehler(a) | Asymptotische Signifikanz(b) | Asymptotisches 95% Konfidenzintervall |             |
|------------------------------|--------|-------------------|------------------------------|---------------------------------------|-------------|
|                              |        |                   |                              | Obergrenze                            | Untergrenze |
| dCt-CXCR3                    | ,708   | ,117              | ,211                         | ,480                                  | ,937        |
| dCtT-MIG                     | ,742   | ,120              | ,147                         | ,507                                  | ,976        |
| dCt-IP10                     | ,575   | ,128              | ,653                         | ,325                                  | ,825        |



Abb. 48 ROC Kurven der Chemokinexpression in der Biopsie zum Zeitpunkt eins mit Abstoßung mindestens mäßig (n=7) zu keine Abstoßung oder kleiner als mäßig (n=12)

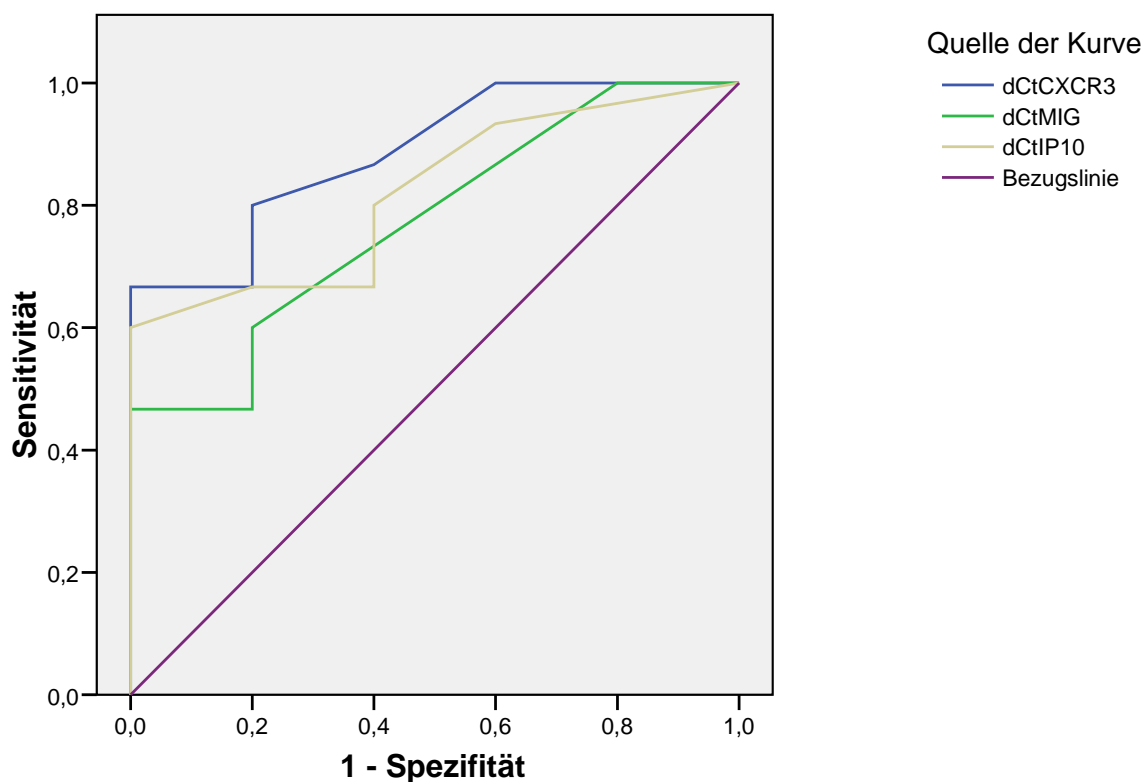


Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

| Variable(n) für Testergebnis | Fläche | Standardfehler(a) | Asymptotische Signifikanz(b) | Asymptotisches 95% Konfidenzintervall |             |
|------------------------------|--------|-------------------|------------------------------|---------------------------------------|-------------|
|                              |        |                   |                              | Obergrenze                            | Untergrenze |
| dCt-CXCR3                    | ,690   | ,126              | ,176                         | ,444                                  | ,937        |
| dCt-MIG                      | ,738   | ,115              | ,091                         | ,512                                  | ,964        |
| dCt-IP10                     | ,655   | ,144              | ,272                         | ,373                                  | ,937        |

Abb.49 ROC Kurven der Chemokinexpression in der Biopsie zum Zeitpunkt zwei mit Abstoßung ja (n=15) oder nein (n=5).

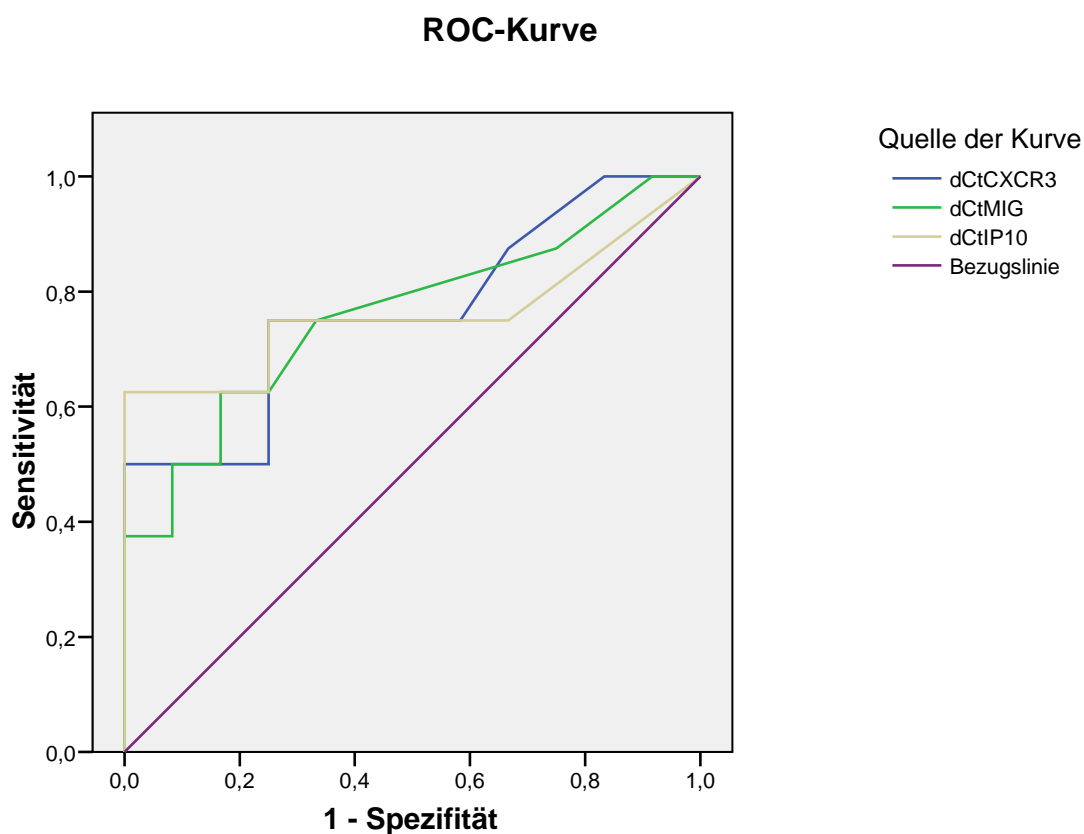
### ROC-Kurve



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

| Variable(n) für Testergebnis | Fläche | Standardfehler(a) | Asymptotische Signifikanz(b) | Asymptotisches 95% Konfidenzintervall |             |
|------------------------------|--------|-------------------|------------------------------|---------------------------------------|-------------|
|                              |        |                   |                              | Obergrenze                            | Untergrenze |
| dCt-CXCR3                    | ,887   | ,078              | ,011                         | ,734                                  | 1,040       |
| dCt-MIG                      | ,773   | ,113              | ,074                         | ,551                                  | ,996        |
| dCt-IP10                     | ,820   | ,098              | ,036                         | ,629                                  | 1,011       |

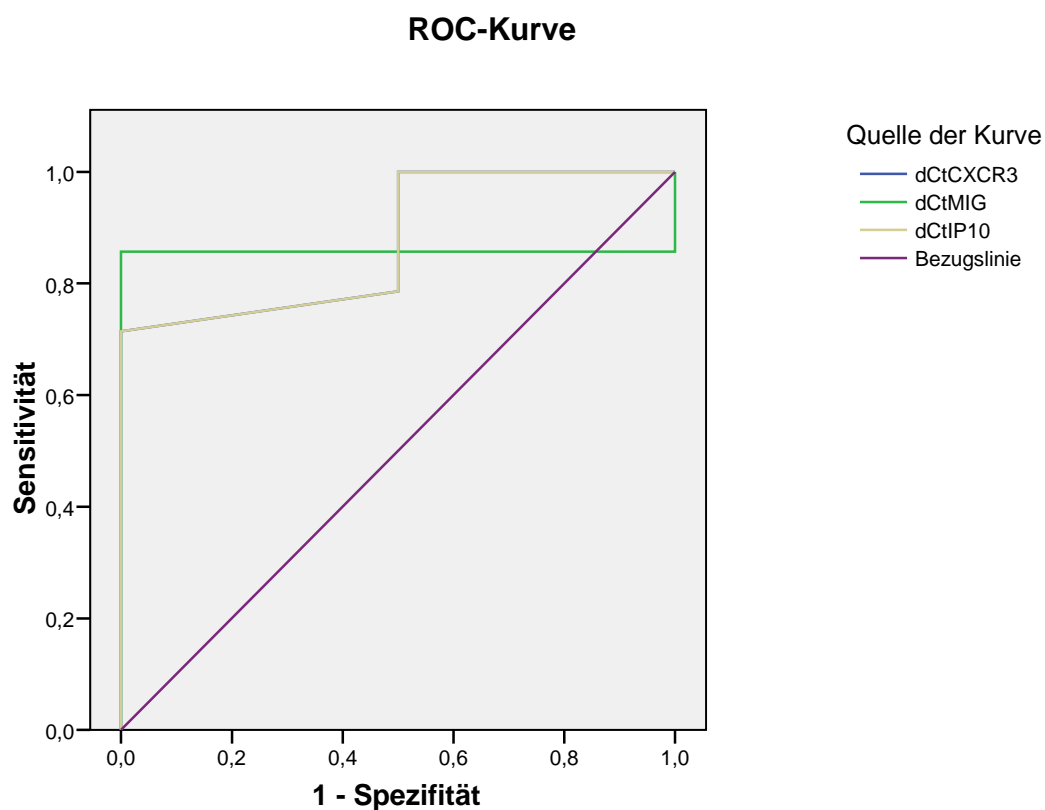
Abb.50 ROC Kurven der Chemokinexpression in der Biopsie zum Zeitpunkt zwei mit Abstoßung mindestens mäßig (n=8) zu keine Abstoßung oder kleiner als mäßig (n=12).



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

| Variable(n) für Testergebnis | Fläche | Standardfehler(a) | Asymptotische Signifikanz(b) | Asymptotisches 95% Konfidenzintervall |             |
|------------------------------|--------|-------------------|------------------------------|---------------------------------------|-------------|
|                              |        |                   |                              | Obergrenze                            | Untergrenze |
| dCt-CXCR3                    | ,766   | ,116              | ,049                         | ,539                                  | ,993        |
| dCt-MIG                      | ,760   | ,117              | ,054                         | ,530                                  | ,990        |
| dCt-IP10                     | ,760   | ,131              | ,054                         | ,504                                  | 1,017       |

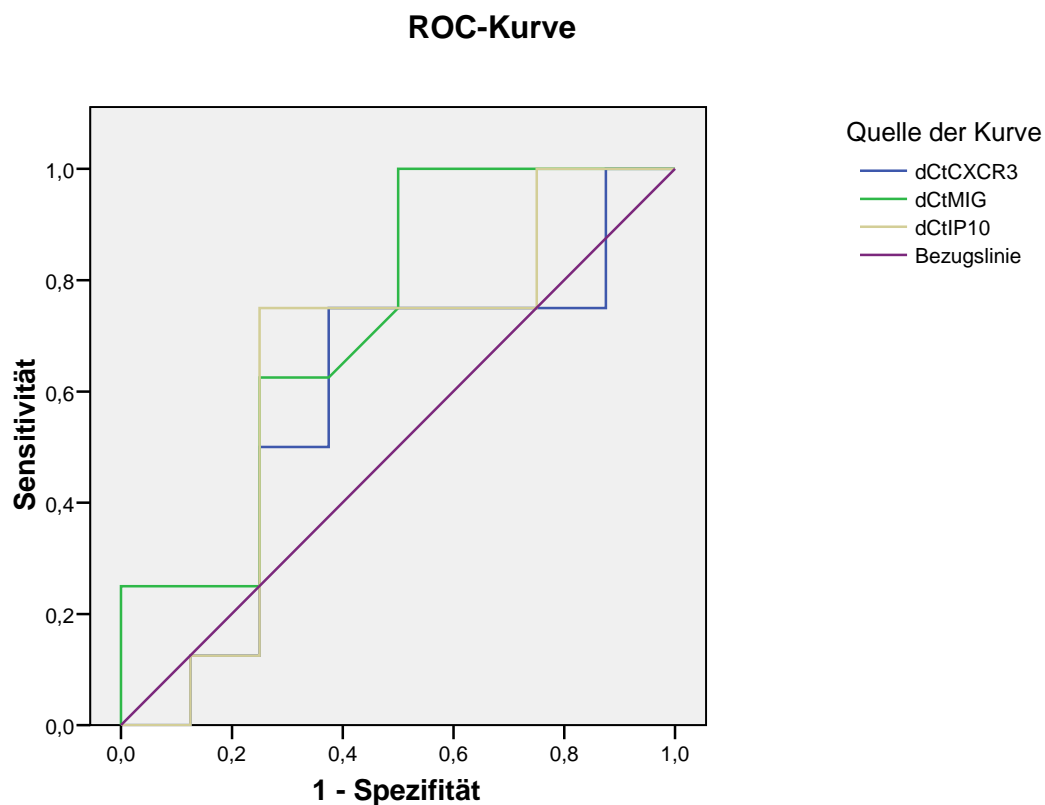
Abb.51 ROC Kurven der Chemokinexpression in der Biopsie zum Zeitpunkt drei mit Abstoßung ja (n=14) oder nein (n=2) als Kriterium sehen wie folgt aus.



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

| Variable(n) für<br>Testergebnis | Fläche | Standard-<br>fehler(a) | Asymptotische<br>Signifikanz(b) | Asymptotisches 95% Konfiden-<br>zintervall |             |
|---------------------------------|--------|------------------------|---------------------------------|--|-------------|
|                                 |        |                        |                                 | Obergrenze                                 | Untergrenze |
| dCt-CXCR3                       | ,875   | ,113                   | ,095                            | ,653                                       | 1,097       |
| dCt-MIG                         | ,857   | ,094                   | ,112                            | ,674                                       | 1,040       |
| dCt-IP10                        | ,875   | ,113                   | ,095                            | ,653                                       | 1,097       |

Abb. 52 ROC Kurven der Chemokinexpression in der Biopsie zum Zeitpunkt drei mit Abstoßung mindestens mäßig (n=8) zu keine Abstoßung oder kleiner als mäßig (n=8).



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

| Variable(n) für Testergebnis | Fläche | Standardfehler(a) | Asymptotische Signifikanz(b) | Asymptotisches 95% Konfidenzintervall |             |
|------------------------------|--------|-------------------|------------------------------|---------------------------------------|-------------|
|                              |        |                   |                              | Obergrenze                            | Untergrenze |
| dCt-CXCR3                    | ,578   | ,153              | ,600                         | ,278                                  | ,878        |
| dCt-MIG                      | ,727   | ,132              | ,128                         | ,468                                  | ,985        |
| dCt-IP10                     | ,641   | ,151              | ,345                         | ,345                                  | ,936        |

### 3.2.4 Zusammenhang von Chemokinexpression und klinischen Parametern

Für keinen Zeitpunkt der Biopsien konnte man einen signifikanten

Zusammenhang zwischen Genexpression und Patienten-

Überleben bis 24 Monate nach oLTX (N = 18), Organüberleben 24 Monate nach oLTX (N = 17), Qualität der Spenderleber (good versus acceptable) und warme Ischiämiezeit feststellen. Zur Beurteilung eines Zusammenhangs von Chemokinexpression und der CIT (kalte Ischiämiezeit) wurden 3 Patientengruppen in Abhängigkeit der Dauer der CIT gebildet. Es konnten hier eine signifikante Zunahme ( $p=0,047$ ) der Expression von CXCR3 mit Zunahme der CIT in der Biopsie zum Zeitpunkt Zwei gezeigt werden.

Zu keinem Zeitpunkt gab es einen signifikanten Zusammenhang zwischen Genexpression und Laborparametern. Auch 24 Monate nach oLTX zeigte sich bei keinem Patienten ( $n=15$ ) ein signifikanter Zusammenhang zwischen Chemokinexpression und Bilirubin im Serum.

Auch keinen signifikanten Zusammenhang gab es zwischen Grunderkrankung des Organempfängers und den Expressionen der Zielgene in der Biopsie zum Zeitpunkt Drei.

### **3.3 Relative Genexpression nach der delta, delta Ct Methode**

Bildet man delta, delta Ct Werte nach der in 2.3.5.7 beschriebenen Methode kann man folgende Signifikanzen nachweisen. Die berücksichtigten Abstoßungen sind durch die histologische Beurteilung in der Biopsie zum Zeitpunkt Drei definiert. Die Anzahl der Abstoßungen im Beobachtungszeitraum von 24 Monaten ist durch alle histologisch dokumentierten Abstoßungen definiert.

Hohe delta, delta Ct Werte für Zeitpunkt Zwei zu Zeitpunkt Eins von IP10 und CXCR3, nicht jedoch von MIG, sind signifikant assoziiert mit einer mindestens mäßigen Abstoßung. Diese delta,delta Ct Werte für alle drei Zielgene zeigen aber keine Signifikanz für

die kalte Ischiämiezeit, die warme Ischiämiezeit, das Patientenüberleben, das Organüberleben und die Organqualität (good versus acceptable) sowie die Anzahl der Abstoßungen in den 24 Monaten nach oLTX.

Die delta, delta Ct Werte für den Zeitpunkt Drei zu Eins und Drei zu Zwei verhalten sich bezüglich der nicht vorhandenen Signifikanz analog. Die delta, delta Ct Werte für den Zeitpunkt Drei zu Eins zeigen jedoch signifikant niedrigere Werte bei schwereren Abstoßungen. Dies zeigt sich mit Mittelwerten für IP10 von 13,77 zu 2,77 (mindestens mäßige Abstoßung) und einem Median von 11,76 zu 1,65 (mindestens mäßige Abstoßung) bei einem p Wert von 0,028.

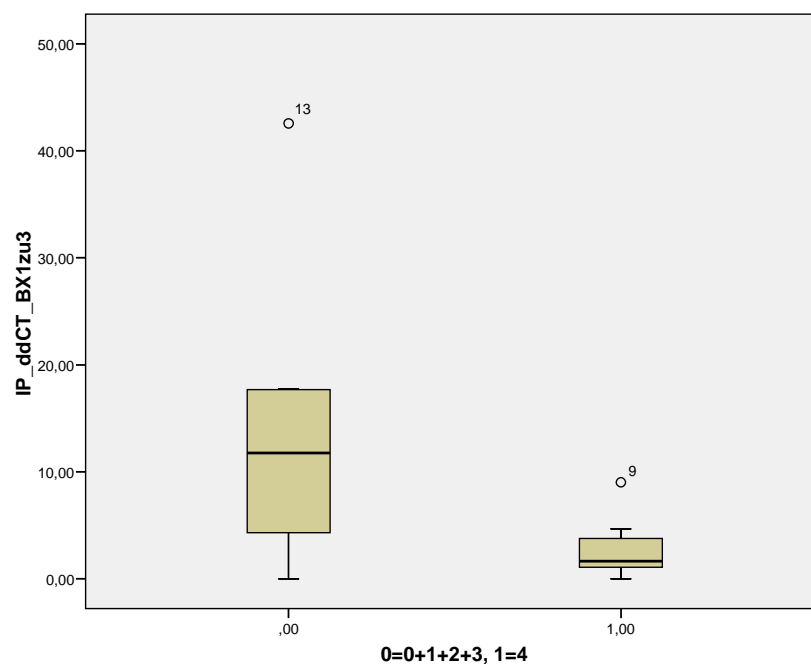


Abb.53 Boxplot für delta,delta Ct aus Biopsie 1 zu 3 von IP10 für Gruppe 0 mit höchstens leichter Abstoßung (0-3) und Gruppe 1 mit mindestens mäßiger Abstoßung (4).

Des Weiteren sind die delta, delta Ct Werte für den Zeitpunkt Drei zu Zwei von CXCR3 in der Gruppe mit mindestens mäßiger Abstoßung signifikant niedriger als in der Gruppe mit geringeren Abstoßungen. Die Mittelwerte sind 18,77 zu 8,62 und der Median 7,12 zu 1,62 bei einem p Wert von 0,028.

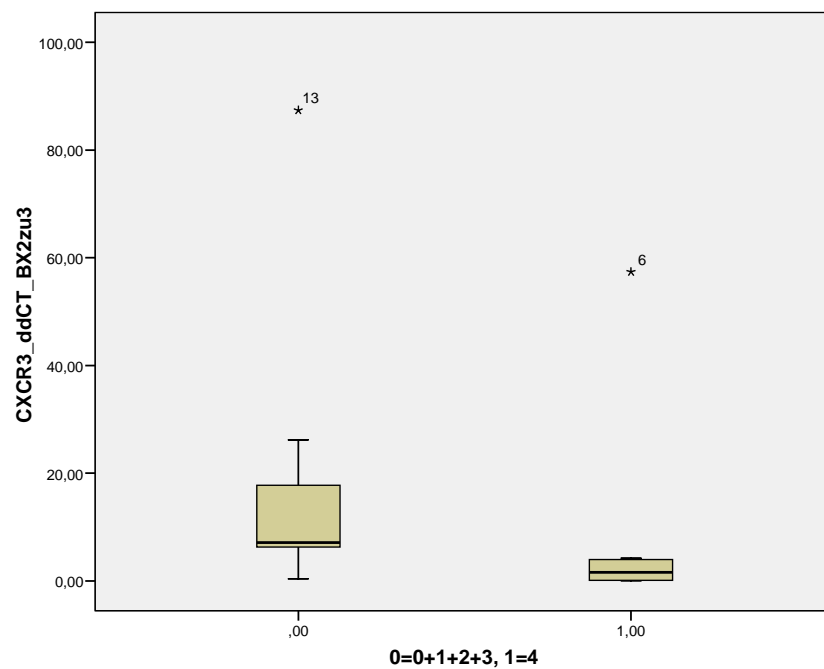


Abb. 54 Boxplot für delta,delta Ct aus Biopsie 2 zu 3 von CXCR3 für Gruppe 0 mit höchstens leichter Abstoßung (0-3) und Gruppe 1 mit mindestens mäßiger Abstoßung (4).



## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Studie wurde erstmalig mittels einer RT-TaqMan-PCR die mRNA Expressionen für IP10, MIG und CXCR3 aus Feinnadel-Leberbiopsien während und nach orthotoper Lebertransplantation beim Menschen gemessen. Wir untersuchten IP10, MIG und CXCR3, weil sie eine Sonderstellung im Chemokinsystem einnehmen und selektiv für einander sind sowie CXCR3 bezüglich der T-Zellen ausschließlich auf aktivierten Th<sub>1</sub> Zellen exprimiert wird.

Ein Zusammenhang zwischen Abstoßung nach oLTX und der mRNA Expression von IP10, MIG und CXCR3 kann aus unterschiedlichen Gesichtspunkten für die Betreuung von transplantierten Patienten nützlich sein, besonders im direktem Zusammenhang mit der Abstoßung, wo die Zielgene ein Hilfsmittel zur Diagnostik von Abstoßungen oder zur Beurteilung der Schwere beziehungsweise der klinische Relevanz einer Abstoßung darstellen könnten.

Darüber hinaus wäre der Chemokinrezeptor CXCR3 mit seiner Struktur als 7-Transmembranrezeptoren ein gutes Ziel für pharmakologische Angriffspunkte.

Sollte sich zeigen lassen, dass die Zielgene die immunologische Aktivität nach Transplantation widerspiegeln, wären sie gute Marker für ein Immunmonitoring zur Patienten-Individuellen-Immunsuppression.

Interessant ist auch die Betrachtung der Expression von IP10, MIG und CXCR3 im Zusammenhang mit dem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI). Hier könnte ein Zusammenhang die Möglichkeit zur Verminderung des Ischämie-Reperfusionsschaden und seiner Folgen eröffnen.

Weiterhin könnten IP10, MIG und CXCR3 als Marker bei der Beurteilung der Qualität von potentiellen Spenderorganen dienen und damit eventuell die Situation der Organknappheit positiv beeinflussen.

#### 4.1.1 Verlauf und Plausibilität der Zielgenexpression

Die Plausibilität der Ergebnisse wird durch die hoch signifikante Korrelation der Expression der Zielgene unterstrichen.

Insgesamt wird eine signifikante Zunahme der Genexpression von MIG und IP10 im chronologischen Verlauf der Proben beobachtet. Die CXCR3 Genexpression steigt während der Transplantation zunächst an, fällt aber innerhalb der ersten Tage nach Transplantation wieder ab (siehe Tabelle 3 und Abbildung 8-11). Dies ist konform zu den Ergebnissen von KS Lang und Mitarbeiter (102), die im Mausmodell zeigten, dass eine Induktion von MIG zu einem Rückgang des Nachweises von CXCR3 auf den Zellen führt. Dies ist einerseits bedingt durch die Bindung des Liganden, andererseits kommt es aber auch durch hohe Ligandenspiegel zu einer Herabregulierung (103). Des weiteren beschreibt Baggiolini (83), dass die Rezeptoren CXCR3 und CCR5 auf Th1-Zellen und CCR3 und CCR4 auf Th2-Zellen herabreguliert werden, sobald die T Zellen durch Antikörper über CD3 und CD28 stimuliert werden. Dies erklärt warum die CXCR3 Expression in den ersten Tagen nach Transplantation eine fallende Tendenz zeigte auch wenn in der Bi-

opsie eine Abstoßung und signifikant gestiegenes IP10 und MIG nachweisbar waren.

Betrachtet man die Mittelwerte für die Biopsate getrennt nach der Abstoßungsschwere, so zeigt sich für die zwei Gruppen ein deutlicher Unterschied in der Kinetik (siehe Abb. 12-14). Die Gruppe mit einer mindestens mäßigen Abstoßung 10-18 Tage nach Transplantation zeigt die höchste Zielgenexpression intraoperativ kurz nach Reperfusion. Die Patienten, die 10-18 Tage postoperativ höchstens eine leichte oder keine Abstoßung hatten, zeigen intraoperativ kurz nach Reperfusion ihre geringste Zielgenexpression. Dies lässt vermuten, dass die Zielgenexpression nach oLTX ein normales Geschehen ist und vor allem im postoperativen Verlauf bezüglich einer Abstoßung einen geringen prognostischen Wert hat. Die Höhe der Expression in der intraoperativen Biopsie kurz nach Reperfusion kann jedoch als Prädiktor des weiteren Verlaufs genutzt werden. Zu dieser Zeit nach oLTX werden der Verlauf und die Zielgenexpression am meisten durch den Ischiämie-Reperfusionsschaden beeinflusst. Folglich ist der Einfluss auf die Zielgenexpression durch den Ischiämie-Reperfusionsschaden stärker als durch das direkte Abstoßungsgeschehen, was eventuell in der immunsuppressiven Therapie nach oLTX begründet liegt.

### 4.1.2 Abstoßung

Abstoßungen nach oLTX sind immer assoziiert mit einem Lymphozyteninfiltrat. Wie es dazu kommt und wie man dies beeinflussen kann, ist ein wichtiges Feld für die Transplantationsforschung, um die Rate der Abstoßungen zu vermindern. Neben anderen Faktoren haben Chemokine dabei eine bedeutende Rolle, da sie die wichtigsten Moleküle für Anlockung und Lenkung sowie Adhäsion von Lymphozyten sind (35). Eine herausragende Stellung nehmen hierbei IP10, MIG und ihr Rezeptor CXCR3 ein. Viele Theorien und Studien sprechen für einen Zusammenhang von Abstoßungsgeschehen und Expression der Chemokine MIG, IP10 und deren Rezeptor CXCR3. So zeigten zum Beispiel A. Minguela und Mitarbeiter, dass ein höheres Serumlevel von Th<sub>1</sub>-Cytokinen, wie INF- $\gamma$ , nach oLTX signifikant mit einem höheren Risiko einer Abstoßung assoziiert ist (48). Gras und Mitarbeiter (105) zeigten, dass ein früher signifikanter Abfall der INF- $\gamma$  Spiegel nach Lebertransplantation bei Kindern mit einer höheren Organakzeptanz assoziiert ist. Li und Mitarbeiter (42) haben nachgewiesen, dass Mäuse, die nach Lebertransplantation mit monoklonalen anti-CD25 Antikörpern behandelt wurden, eine akute Abstoßung erlitten und eine signifikante Erhöhung von IL2, IL10 und INF- $\gamma$  mRNA gemessen werden konnte. Dies führten sie auf eine erhöhte anti-donor T-Zellaktivität und eine verminderte T-Zell-Apoptoserate zurück (43, 42). Goddard und Mitarbeiter zeigten mit Hilfe der Immunhistochemie, dass IP 10 und MIG in der akuten und chronischen Abstoßung an Nachweisintensivität zunehmen (35). Miura und seine Arbeitsgruppe (65) untersuchten die MIG- und IP10- sowie CXCR3- Expression an Mäusen nach Herztransplantation. Sie zeigten mittels Immunhistochemie und relativer

Genexpression, dass MIG zum Zeitpunkt der Abstoßung anstieg und dass eine Behandlung mit MIG- Antikörpern das abstoßungsfeie Überleben verlängerte. Hancock und Mitarbeiter (66) zeigten, dass im Mausmodell CXCR3 nach Herztransplantation eine entscheidende Rolle in Bezug auf Transplantabstoßung spielt. So konnten sie zeigen, dass CXCR3 defiziente Mäuse eine starke Resistenz gegenüber akuten Abstoßungen entwickelten. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass mit monoklonalen Anti-CXCR3- Antikörpern behandelte Mäuse eine deutliche Verlängerung des Organüberlebens aufweisen. Dies konnten sie sogar beobachten, wenn diese Therapie erst mit der ersten Abstoßung begonnen wurde. Die Beobachtungen gingen mit einer signifikant verminderter Anzahl an aktivierten T-Zellen im Transplantat und signifikant verminderter INF- $\gamma$  Expression einher.

Auch die hier gewonnen Ergebnisse zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen Abstoßung, Abstoßungsschwere, Abstoßungshäufigkeit und Expression der Chemokine IP10 und MIG sowie deren Rezeptor CXCR3, der je nach Zeitpunkt der Biopsie unterschiedlich signifikant ist. Betrachtet man alle Biopsate, weisen Biopsate mit einer Abstoßung eine hoch signifikant vermehrte Genexpression für IP10, MIG und CXCR3 auf. Bei der Betrachtung aller Biopsate ist aber zu bedenken, dass die intraoperativen Biopsate per Definition als Abstoßungsfrei galten, auf diese aber nicht untersucht wurden. Die Zielgenexpression ist besonders in diesen Biopsaten durch andere Faktoren, wie zum Beispiel Konservierungsschaden, Grunderkrankung und „klinischem Zustand“ des Spenders, Ischiämie-Reperfusionsschaden und chirurgischem Stress, beeinflusst. Dass man trotz allem eine signifikant niedrigere Zielgenexpression als bei den Biopsaten mit Abstoßung 10-18

Tage nach Transplantation findet, kann für eine übergeordnete Bedeutung bzw. Expression der Zielgene bei Abstoßung sprechen. Es kann aber in Anbetracht der Tatsache, dass in 14 von 16 Proben 10-18 Tage nach Transplantation eine Abstoßung nachweisbar war, nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um eine generell vermehrte Expression im postoperativen Verlauf handelt.

Betrachtet man die verschiedenen Zeitpunkte getrennt, so zeigt sich, dass Patienten mit einer Abstoßung 10-18 Tage nach Transplantation im Vergleich zu den abstoßungsfreien Patienten zu allen Zeitpunkten eine vermehrte Zielgen-Expression nachweisen. Dieser Unterschied ist in den intraoperativen Biopsaten kurz nach Reperfusion für CXCR3 hoch signifikant und für IP10 signifikant.

In der Untersuchung der diagnostischen Aussagekraft der Genexpression von IP10, MIG und CXCR3 bezüglich Abstoßung zeigt sich MIG als bester Parameter (siehe Tabelle 5). 10-18 Tage nach Transplantation zeigt die Genexpression von MIG eine Sensitivität von 83,3 % und eine Spezifität von 98 % für die Diagnose einer akuten Abstoßung und erfüllt damit die Ansprüche an einen validen Marker. Aufgrund der hohen Aussagekraft der Genexpression von MIG bezüglich Abstoßung trotz geringer Gesamt-Genexpression, lässt sich ableiten, dass die Genexpression von MIG am wenigsten durch andere Faktoren neben Abstoßung beeinflusst wird. Erstaunlich ist, dass die intraoperative IP10 Genexpression eine signifikante Vorhersagekraft für die Abstoßungen 10-18 Tage postoperativ hat, aber die Genexpression zum Zeitpunkt der Abstoßung nicht. Der Grund hierfür könnte einerseits im Studiendesign liegen, da die Zahl der Biopsate 10-18 Tage postoperativ geringer ist als intraoperativ, oder aber andererseits auch daran, dass im postoperativen Verlauf die IP10 Genexpression bei

allen Patienten unabhängig von Abstoßungen durch viele andere Faktoren ansteigt, die aber auf die intraoperativen Biopsie noch keinen Einfluss haben. CXCR3 ist nur in der Zusammenfassung aller Biopsate unabhängig vom Zeitpunkt ein signifikanter Prädiktor für eine Abstoßung 10-18 Tage nach Transplantation. Dies könnte in der Herabregulierung durch seine Liganden oder in seiner intrazellulären Speicherung, welche die Aussagekraft der mRNA Expression einschränkt, begründet sein.

Für alle drei Zielgene zeigt sich in der ROC Kurve für alle Biopsate zusammengefasst eine hohe Signifikanz mit einer moderaten Akkuranz. Die höchste Akkuranz bezüglich der Trennschärfe zwischen Abstoßung oder nicht liefert die ROC Kurve der intraoperativen Biopsate kurz nach Reperfusion, vor allem für IP10. Dies unterstützt die Theorie der höheren Aussagekraft der intraoperativen Biopsate.

Bei der Untersuchung der Assoziation von CXCR3- Chemokinexpression und akuter Abstoßung, beziehungsweise langfristigem klinischem Verlauf, ist eine sehr genaue Definition der Abstoßungskriterien nötig. Wertet man jedes frühe Lymphozyteninfiltrat als Abstoßung, kann es sein, dass man Zustände, die eventuell den klinischen Verlauf positiv beeinflussen können in den Zusammenhang mit der Expression setzt und dann entweder keinen signifikanten Zusammenhang findet oder einen der mit einem klinisch besseren Verlauf verbunden ist. Denn diese frühen Lymphozyteninfiltrate könnten Prozesse einer „Toleranzentwicklung“ sein (18). Folglich kann bei unscharfer Trennung ein fehlender Zusammenhang vorgetäuscht werden. Es ist also wichtig, die Grenze, ab der es sich um einen ergebnisverschlechternden Prozess handelt, genau zu definieren. Deshalb wurden in dieser

Studie die Ergebnisse nicht nur nach dem Zielereignis Abstoßung sondern auch graduiert nach der histologischen Schwere der Abstoßung ausgewertet.

Es konnte gezeigt werden, dass das Maß der Zielgen-Expression signifikant mit der Schwere der Abstoßung assoziiert ist. Patienten mit einer mindestens mäßig schweren Abstoßung 10-18 Tage postoperativ hatten intraoperativ, kurz nach Reperfusion in ihrer Leberbiopsie signifikant höhere Zielgen-Expressionen, als Patienten mit einer leichteren Abstoßungen oder keiner. Mit dieser Signifikanz zwischen Schwere der Abstoßung und Zielgen-Expression wird die Zielgen-Expression zu einem sehr interessanten Marker beziehungsweise Prädiktor für relevante Abstoßungen und könnte somit hilfreich für die Entscheidung zu einer Abstoßungs-Steroid-Stoß-Therapie sein. Die bisher zur Verfügung stehenden Marker, wie AST, ALT und konjugiertes Bilirubin sind zwar mit der Schwere einer akuten Abstoßung assoziiert, aber es gibt bisher keinen singulären biochemischen Marker, der die Schwere einer akuten Abstoßung gut widerspiegelt (89). Wie diese Studie zeigt bekommt man mit der Expression von IP10, MIG und CXCR 3 einen sehr guten weiteren Marker, um die Schwere einer Abstoßung frühzeitig zu beurteilen und eventuell unnötige immunsuppressive Eskalierung, die unter anderem einen negativen Einfluss auf eine „Toleranzentwicklung“ haben können, zu vermeiden. So ergab z.B. die Datenbankanalyse von Wiesner (89), dass gesündere Patienten eher eine akute Abstoßung erlitten. Diese aber den klinischen Verlauf nicht signifikant negativ beeinflusste und in der Tendenz sogar verbesserte. Im Gegensatz dazu verschlechtern schwere akute Abstoßungen den klinischen Verlauf.



Es zeigte sich in dieser Studie auch, dass Patienten mit mehr als einer Abstoßung im Beobachtungszeitraum von 24 Monaten nach oLTX, eine erhöhte Expression von IP10, MIG und CXCR3 haben. Interessanterweise ist dieser Zusammenhang nur in der intraoperativen Biopsie während der Spenderorganpräparation signifikant.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die frühe Genexpression von CXCR3, IP10 und MIG die Schwere einer Abstoßung widerspiegelt und ihre Häufigkeit vorhersagen kann. Des Weiteren könnte diese Expression ein durch den Spender beziehungsweise das Spenderorgan bestimmtes „Setting“, welches im Sinne der Anzahl der Abstoßungen richtungsweisend ist, darstellen. Trotz der klaren beschriebenen Assoziation kann man keinen Zusammenhang zwischen Organ- beziehungsweise Patientenüberleben im Beobachtungszeitraum und Zielgenexpression nachweisen. Auch die in vielen Literaturstellen als prognostisch für die chronische Abstoßung beschriebenen Laborparameter Gamma-GT und Bilirubin zeigen keinen Zusammenhang mit der Zielgenexpression. Diese Sachverhalte kann man dahin gehend interpretieren, dass entweder die gemessenen Abstoßungsschweregrade und -häufigkeiten keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf haben, oder dass der Beobachtungszeitraum dieser Studie für die Fragestellung nach einem langfristigem klinischem Verlauf zu kurz ist, da akute Abstoßungen nach oLTX meistens gut therapiert werden können und nicht mit dem Patienten- und/oder Organüberleben assoziiert sind.

### 4.1.3 Immunsuppression

Die signifikant vermehrte Expression von IP10, MIG und CXCR3 sowie der signifikante Zusammenhang zu den Abstoßungsschweregraden in dieser Studie lassen den Schluss zu, dass die Zielgene eine wichtige Rolle im Abstoßungsgeschehen spielen. Dies wurde auch schon in verschiedenen Studien an Mäusen gezeigt, in denen durch knock-out Mäuse oder Antikörper gegen die Chemokine eine Verlängerung des Organüberlebens erreicht werden konnte (65, 66). Unter Annahme dieses Zusammenhangs stellen IP10, MIG und CXCR3 sehr gute Ziele für eine pharmakologische Intervention zur Vermeidung oder Therapie von Abstoßungen dar. Selbstverständlich kann diese Studie, wie alle bisher durchgeführten Studien, dafür nur Ideen oder Ansatzpunkte liefern. Denn selbst wenn CXCR3 und IP10 sowie MIG höchst selektiv für einander sind, bringt der Eingriff in dieses System eine Veränderung der gesamten immunologischen Konstellation mit sich. Das Ausmaß dieser kann bisher nicht hinreichend beurteilt werden. So zeigen verschiedene Studien (96), dass eine eindeutige und ausschließliche Zuteilung von Th<sub>1</sub> Zellen zu Inflammation und Abstoßung sowie Th<sub>2</sub> Zellen zu Toleranzentwicklung nicht mehr zu halten ist. So wird IL2, welches von Th<sub>1</sub> Zellen sezerniert wird, in gewissem Umfang benötigt, um Voraussetzungen für eine Toleranzentwicklung zu schaffen. Larsen und Mitarbeiter zeigten (97), dass eine Unterdrückung von IL2 das Langzeitorganüberleben und die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen (Tregs), welche man für die Entwicklung einer Toleranz als hauptverantwortlich annimmt (96), negativ beeinflussen kann. Mele und Mitarbeiter (99) zeigten, dass INF- $\gamma$ , bei früher und moderater Hochregulierung mit einer besseren Transplantorgan Akzeptanz assoziiert ist. Folglich

kann es diesbezüglich kontraproduktiv sein die Th<sub>1</sub> Signale wie zum Beispiel INF- $\gamma$ , IL2 und IP10 sowie MIG komplett zu unterdrücken. Genau das könnte aber Folge einer Blockade von CXCR3, MIG und IP10 sein, vor allem wenn eine Solche noch mit Calcineurininhibitoren kombiniert wird.

#### 4.1.4 Immunmonitoring

Da in dieser Studie eine erhöhte Genexpression von MIG, IP10 und CXCR3 mit einer Abstoßung sowie deren Schwere und Häufigkeit assoziiert ist und vor allem in der intraoperativen Biopsie kurz nach Reperfusion für CXCR3 und IP10 ein signifikanter Zusammenhang mit dem Ereignis Abstoßung besteht, lässt sich vermuten, dass eine höhere Zielgenexpression dieser ein erhöhtes Risiko für eine Abstoßung darstellt. Daher ist es vorstellbar, dass man anhand der Expression die immunsuppressive Therapie und das Ausschleichen einer solchen steuern könnte. Würde man eine Studie mit Biopsien im weiteren Verlauf nach oLTX durchführen, könnte man eine Verlaufsnormalverteilung der Expression erstellen und anhand dieser eventuell Patienten selektieren, die eine „periphere Toleranz“ entwickelt haben und so unnötige immunsuppressive Therapie vermeiden, ohne dass man den riskanten Weg der „Try and Error“ Methode wählen muss. Zurzeit gibt es für die Beurteilung der Toleranz keinen zuverlässigen und die Ansprüche erfüllenden Test (101). Viele Ideen und Ansätze diesbezüglich zeigten sich letztendlich als nicht brauchbar, wie zum Beispiel die Suche nach Mikrochimerismen. Da die Mikrochimerismen vermutlich nicht spenderinduziert sind, sondern schon vorher im

Empfänger bestehen, wird diese Methode inzwischen als ungeeignet angesehen. (100).

Könnte man schon früh eine Langzeitprognose für den jeweiligen Patienten in Bezug auf chronische Abstoßung treffen, wäre eine individuell angepasste Immunsuppression möglich. Den Beweis hierfür können wir mit unserem Studiendesign letztendlich nicht erbringen. Durch den signifikanten Zusammenhang der Genexpression von CXCR3, IP10 und MIG in der intraoperativen Biopsie während der Spenderorganpräparation und der Anzahl der Abstoßungen im Beobachtungszeitraum lässt sich aber vermuten, dass hohe CXCR3 Spiegel zum Zeitpunkt der Transplantation und des Ischiämie-Reperfusionsschaden ein Zeichen beziehungsweise ursächlich für eine folgend erhöhte immunologische Reaktivität sind. Hier sind aber noch Studien, die speziell auf diese Fragestellung zugeschnitten sind, nötig und sinnvoll.

#### 4.1.5 Ischiämie-Reperfusionsschaden (IRI)

Das der Ischiämie-Reperfusionsschaden den klinischen Verlauf nach Lebertransplantation negativ beeinflusst, indem er das Risiko für frühes Organversagen und für akute sowie chronische Abstoßung erhöht, beschrieben Howard und Mitarbeiter schon 1990 (78). Im Verlauf zeigten viele Arbeiten, dass der Ischiämie-Reperfusionsschaden direkten Einfluss auf das adaptive Immunsystem und somit das Organüberleben hat (18). Eine Studie von Colletti (86) zeigte, dass die Stimulation von INF- $\gamma$  und demzufolge von IP10 das Chemokinverhältnis von ELR zu NON-ELR-CXC-Chemokinen verschiebt und dadurch, trotz unveränderter Neutrophilenrekrutierung, den Ischiämie-Reperfusionsschaden

vermindert. Dies steht im Widerspruch zu etlichen anderen Studien, wie zum Beispiel die von Hancock 2001<sup>(67)</sup>. Dessen Arbeit zeigt, dass Herzen von IP10 defizienten Mäusen nach Transplantation deutlich länger überlebten, wo hingegen die IP10-Defizienz der Organempfänger keinen Vorteil brachte. Dies lässt vermuten, dass eine frühe IP10 Expression im Transplantat eine immunologische Reaktion in Gang setzt und ein immunologisches Milieu schafft, welches später zu einer Abstoßung prädisponiert. Dass IP10 im Rahmen der Transplantation und vor allem durch den Reperfusionsschaden vermehrt exprimiert wird, zeigten auch schon Yuan-Ji Day und Mitarbeiter 2004 im Mausmodell <sup>(76)</sup>. Als Grund für die vermehrte Expression von IP10 im Vergleich zu MIG wird postuliert, dass der Promoter von IP10 eine funktionelle Bindungsstelle für NF- $\kappa$ B hat <sup>(67)</sup>, welches durch TNF $\alpha$  vermehrt exprimiert wird. TNF $\alpha$  wiederum wurde von Flach <sup>(77)</sup> 30-60 min nach Reperfusion signifikant erhöht nachgewiesen und es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen hoher TNF $\alpha$  Expression und nachfolgenden akuten Abstoßungen. Yuan Zhai zeigte 2006 <sup>(79)</sup>, dass der Ischämie-Reperfusionsschaden nach Lebertransplantation bei Ratten zu einer Expression der CXCR3 Liganden MIG, IP10 und ITAC führt und dadurch CXCR3+CD4+ T-Zellen im Transplantat akkumulieren. Die Genexpression erreichte ihr Maximum 24 Stunden nach Reperfusion. Diese Arbeitsgruppe konnte durch Blockade von CXCR3 das Überleben in der Studie von 40% auf 95% ( $p < 0,01$ ) signifikant steigern. Bemerkenswert bei dieser Studie ist auch, dass IP10, MIG und I-TAC beim Ischämie-Reperfusionsschaden wahrscheinlich nicht wie üblich durch INF- $\gamma$ , da dieses nicht vermehrt exprimiert wird, sondern vermutlich durch den Toll-Like-Rezeptor 4 hoch reguliert werden.

Die Untersuchungen meiner Arbeit zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen Abstoßung und Genexpression für CXCR3 und IP10 in den intraoperativen Biopsaten kurz nach Reperfusion und deuten somit daraufhin, dass die Zielgenexpression zur Zeit eines möglichen Ischiämie-Reperfusionsschaden den Verlauf in Bezug auf Abstoßung und deren Schwere beeinflusst. Jedoch kann aufgrund des Studiendesigns nur vermutet werden, dass die Zielgenexpression durch den Ischiämie-Reperfusionsschaden bewirkt ist. Bestärkt wird diese Vermutung durch einen hier nachgewiesenen signifikanten Zusammenhang zwischen der kalten Ischiämiezeit (CIT) und der CXCR3 Genexpression kurz nach Reperfusion und den Ergebnissen anderer Studien, wie zum Beispiel die Studie von Melter (47) und Minguela (48). Diese Arbeitsgruppen zeigten, dass Chemokine im Zusammenhang mit dem ischiämischen Reperfusionsschaden nach Organtransplantation exprimiert werden (47). Laut Nagpal (95) ist IP10 in der Lage, CXCR3 zu induzieren. Dies kann aber nicht der einzige Stimulator sein, da wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der IP10 Genexpression während Spenderorganpräparation und der kalten Ischiämiezeit sehen. Es ist also denkbar, dass CXCR3 nach Reperfusion nicht oder nicht alleine durch IP10 induziert wird, sondern dass dabei ein weiterer, bisher unbekannter Mechanismus, der durch eine lange kalte Ischiämiezeit getriggert wird, eine wichtige Rolle spielt.

Auch wenn unser Studiendesign den Nachweis des entscheidenden Faktors für die bei einigen Patienten vermehrte Expression der Zielgene nicht zulässt (hierfür wäre sicher eine Studie mit einer höheren Patientenzahl nötig), konnte dennoch deutlich gezeigt werden, dass schon in der frühen Phase der oLTX ein Teil des kli-

nischen Verlaufs nach oLTX prädispositioniert wird. Dieser Sachverhalt bietet gute Möglichkeiten für eine pharmakologische Intervention. Hypothetisch könnte man sich vorstellen, dass wenn zum Beispiel schon während der Transplantation IP10 durch monoklonale Antikörper geblockt würde, es möglich wäre, die pathologische Leukozytenrekrutierung, welche zu entsprechenden Folgereaktionen beziehungsweise zum entsprechenden immunologischen Milieu mit Begünstigung von folgenden Abstoßungen führt, zu vermeiden. In Anbetracht der hier diskutierten frühen Expression von IP10 im Transplantat muss man die Auswertung der Ergebnisse nach der delta-delta Ct Methode kritisch sehen, denn für diese wurde die Biopsie während Transplantatpräparation für jeden Patienten als sein Kontrollwert benutzt. Dies birgt also die Fehlerquelle, dass der gesetzte Kontrollwert eventuell der eigentlich Verlauf-Bestimmende Wert ist.

#### 4.1.6 Organbeurteilung

Es fehlt bisher ein objektiver, signifikanter und spezifischer Marker der es zulässt die Qualität eines Spenderorgans zu beurteilen. Wiesner und Mitarbeiter (89) analysierten Daten der Lebertransplantations-Datenbank und kamen zu dem Ergebnis, dass 48 % aller Patienten in den ersten 6 Wochen nach Lebertransplantation eine akute Abstoßung erlitten, im Median am 8 Tag. Sie zeigten auch, dass dieses Ereignis weder anhand der meisten präoperativen klinischen Daten vom Empfänger noch vom Spender in seinem Zeitpunkt oder in seiner Inzidenz signifikant vorhergesagt werden konnte. In meinen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von IP10, MIG und CXCR3 während Transplantatpräparation und der Anzahl der Abstoßungen im Beobachtungszeit-

raum von 24 Monaten gibt. Obwohl wir für die einzelnen Faktoren, die als die Organqualität beeinflussend beschrieben werden, keinen Zusammenhang mit der Zielgenexpression darstellen konnten, ist es aufgrund der aufgezeigten signifikanten Zusammenhänge vorstellbar, dass die Messung der Expression von CXCR3, IP10 und MIG mRNA ein sinnvolles Instrument ist, um die Organqualität zu beurteilen. Idealerweise würde die Genexpression die multiplen, schwer zu gewichtenden und zum Teil auch unbekannten Einflussgrößen für die Qualität eines Organs in einem objektiven Wert zusammenfassen.

#### 4.1.7 Vergleich mit anderen Studien

Krukemeyer und Mitarbeiter (45) untersuchten vier Biopsate nach oLTX mit Hilfe einer RT-PCR, die bei Verdacht auf akute Abstoßung gewonnen wurden. Als Kontrollprobe benutzten sie eine Gewebeprobe einer normalen Leber von einem gesunden Spender. Als Housekeepinggen wählte diese Gruppe das beta-aktin, als Zielgen unter Anderem IP10, MIG, ITAC und CXCR3. Sie fanden dabei eine vermehrte Expression von IP10 und ITAC in den Biopsaten bei akuter Abstoßung im Vergleich zur Kontrollbiopsie. Hierzu muss man jedoch kritisch anmerken, dass die Arbeitsgruppe nur einen Kontrollwert von einem gesunden Probanden, aber keine intraindividuellen Vergleichsbiopsien, sowie Biopsien von Patienten nach oLTX mit abstoßungsfreien Verlauf untersuchte. Deshalb zeigen die Daten keine Chemokininduktion durch Abstoßung und stehen somit auch nicht im Widerspruch zu meinen Ergebnissen.

Goddard und Mitarbeiter (35) zeigten via Immunhistochemie aus humanen Leberbiopsaten, dass Lymphozyten in der Phase der



Abstoßung stark positiv für CXCR3 sind und dieser Rezeptor auch funktional aktiv ist. Diese Beobachtung passt zu Ergebnissen anderer Studien, die sich mit dem Thema der Organtransplantation und Chemokinen beziehungsweise Chemokinrezeptoren beschäftigen. In verschiedenen Studien wurde der Zusammenhang zwischen Abstoßung und Expression von CXCR3 und seiner Liganden nachgewiesen, so z.B. für Nierentransplantation am Menschen (68), für Lungentransplantation am Menschen (72) und für Herztransplantation am Menschen (69, 70, 71). Melter und Mitarbeiter (69) haben in ihrer Studie einen deutlichen Zusammenhang zwischen Abstoßung nach Herztransplantation beim Menschen und dem Vorhandensein von CXCR3+ T Zellen und IP10 festgestellt.

Der entscheidende Unterschied dieser Studien zu meiner Arbeit ist, dass wir nicht die Expression von CXCR3 an der Zelloberfläche nachgewiesen haben, sondern die mRNA des Proteins. LM Ebert und Mitarbeiter (88) haben gezeigt, dass CXCR3 als Protein in großen Mengen intrazellulär gespeichert wird, so dass es bei Induktion direkt in die Zellmembran eingebaut werden kann, ohne dass sofort eine im gleichen Maße vermehrte Transkription stattfinden muss. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Differenz zwischen immunhistochemischen und PCR Ergebnissen.

Die zum Teil geringere Expression der CXC Chemokine unserer Studie im Gegensatz zu einigen tierexperimentellen Studien, wie zum Beispiel die von Hardstedt und Mitarbeiter (104), in der mittels RT-PCR aus Leberbiopsaten nachgewiesen wurde, dass CXCR3 und seine Liganden nach intraportaler Xenotransplantation (Schwein auf Affe) von Inselzellen ohne Immunsuppression signifikant ansteigen und mit T Zell- Rekrutierung in der akuten Absto-

ßung assoziiert sind, kann man mit dem Ergebnis einer Studie von F Conti und Mitarbeiter (90) erklären. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass bei einer immunsuppressiven Therapie mit Cyclosporin A in einer akuten Abstoßung die IL2-Expression nicht anstieg. Diese ist aber nötig um T Zellen zu aktivieren und INF- $\gamma$  auszuschütten, welches wiederum die CXC Chemokine IP10 und MIG so wie deren Rezeptor CXCR3 vermehrt exprimieren lässt. Stattdessen fanden sie eine vermehrte Expression von IL4 als alternativen Weg.

Wichtig für die Interpretation der Studie ist ebenso der Zeitpunkt der gewonnen Biopsate. In diesem Studiendesign wurde ein früher Zeitpunkt nach oLTX gewählt. Es ist vorstellbar, dass ein Anstieg der IP10 Genexpression im späteren Verlauf deutlicher mit einer Abstoßung assoziiert ist, da andere Faktoren für einen Anstieg der Expression, wie zum Beispiel der Ischämie-Reperfusionsschaden und das chirurgische Trauma in geringerem Maße gegeben sind. Die Biopsate der Herztransplantationsstudie von M Melter und Mitarbeitern wurden zum Beispiel (69) deutlich später im Verlauf gewonnen.

Vergleicht man diese Studie mit Arbeiten an anderen Organen, ist auch zu bedenken, dass das gewählte Housekeepinggen in den unterschiedlichen Organen unterschiedlich stark exprimiert wird. So hat zum Beispiel die Niere eine deutlich geringere GAPDH Expression als die Leber, so dass die Höhe der Expression von IP10, MIG und CXCR3 in dieser Studie nicht mit der aus der Dissertation von M.Quante (gleiche Arbeitsgruppe) verglichen werden kann. Möglich ist jedoch ein Vergleich der Expressionskinetik.

#### 4.1.8 Vergleich mit Transplantationen anderer Organe

Im Vergleich zwischen Herz-, Nieren-, Leber- und Lungentransplantation haben Leber und Lunge die stärkste Chemokinexpression durch den Ischiämie-Reperfusionsschaden (73), wohingegen die Niere nur eine moderate Expression aufweist (74). Auch das Herz zeigte einen langsamen und moderaten Anstieg der Expression, vor Allem in den Endothelzellen und nahezu keinen in den Herzmuskelzellen (75). Hier muss man sicher kritisch anmerken, dass ein Vergleich der verschiedenen Organe schwierig ist, da die meisten Studien mit GAPDH als Housekeepinggen durchgeführt wurden und dieses in Geweben mit hohem Energieumsatz, wie zum Beispiel dem Herzmuskel, stärker exprimiert wird und so eine geringe Expression des Zielgens vortäuscht.

In mehreren Studien wurde eine Assoziation von Chemokinexpression und akuten Abstoßungen bei verschiedenen Organtransplantationen gezeigt. Die Ergebnisse dieser Studien können jedoch aufgrund der immunologischen Besonderheiten der Leber und Lebertransplantation nicht ohne weiteres auf diese übertragen werden. Moench und Mitarbeiter (49) haben zum Beispiel gezeigt, dass der CCR5 Polymorphismus, der bei Nierentransplantation das Risiko für eine akute Abstoßung herabsetzt (50), bei Lebertransplantation dies nicht vermag, sondern sogar das Risiko für eine ischiämische Gallengängläsion erhöht und damit den klinischen Verlauf verschlechtert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine akute Abstoßung nach Lebertransplantation, im Gegensatz zu den anderen Organtransplantationen, den klinischen Verlauf nicht negativ beeinflussen muss (89).

Einen interessanten Unterschied zwischen den verschiedenen Organen mit Bezug auf das immunologische Milieu bei Abstoßung konnte auch die Arbeitsgruppe um F Conti (90) aufzeigen. Sie zeigten, dass nach oLTX und Immunsuppressionen mit Cyclosporin A als Alternative zum unterdrückten IL2 vermehrt IL4 exprimiert wird. Diesen alternativen Weg mit erhöhter IL4 Expression konnten sie aber nur in der Leber finden. Bei Nieren- und Herztransplantationen sind die IL4 Spiegel auch bei einer akuten Abstoßung stabil (93, 92, 91). Außerdem konnte die Arbeitsgruppe um Klugewitz (40, 41) zeigen, dass sinusiodalen Endothelzellen (SLECs) die Cytokinsekretion von Th<sub>1</sub> Zellen unterdrücken können, während Th<sub>2</sub> Zellen weiterhin IL4 sezernieren können. Somit ist die Leber in der Lage, ihr Cytokinmuster zugunsten eines antiinflammatorischen Musters zu verschieben. Unabhängig, ob von der Leber selbst ausgehend oder durch Cyclosporin A verursacht, könnte diese Umgehung des IL2 Weges und somit des INF- $\gamma$  und der NON-ELR Chemokine womöglich ein Grund für die insgesamt schwächere „Zielgenexpression“ bei Abstoßung im Vergleich zu anderen Organtransplantationen sein.

#### 4.1.9 Delta,Delta Ct Werte

Durch die Verwendung der präoperativen Biopsate als individuelle Kontrollbiopsie für jeden Patienten, ist es möglich, die Ergebnisse nach der ddCt Methode Patienten-intraindividuell auszuwerten. Allerdings stellt sich hier das Problem, dass eine Beeinflussung des klinischen Verlaufs durch Gegebenheiten, die schon in dieser Biopsie gesetzt sind, nicht erkannt wird. Dennoch ist es sinnvoll die delta,delta Ct Methode zu betrachten, denn wenn die Kinetik der Zielgenexpression unabhängig vom Startpunkt der Zielge-

nexpression eine Abstoßung anzeigt, hätte man einen sehr Interferenz stabilen Parameter.

Es konnten anhand dieser Auswertungsmethode nur wenige signifikante Zusammenhänge zur Abstoßung dargestellt werden. Patienten mit einer mindestens mäßigen Abstoßung 10-18 Tage nach Transplantation hatten in ihren Biopsaten nach Reperfusion einen signifikant höheren Anstieg der Genexpression von IP10, als Patienten mit geringen oder keinen Abstoßungen 10-18 Tage nach Transplantation.

Interessanterweise haben die Patienten, die mindestens eine mäßige Abstoßung 10-18 Tage nach Transplantation zeigen in ihren Biopsaten zu dieser Zeit einen signifikant geringeren Anstieg der IP10 Genexpression in Bezug auf den Ausgangswert während Spenderorganpräparation. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass gar nicht der Anstieg von IP10 und CXCR3 in der Biopsie 10-18 Tage nach Transplantation entscheidend oder wegweisend ist, weil hier die Chemokine und ihre Rezeptoren sowieso hoch reguliert sind, sondern hohe Ausgangswerte in den intraoperativen Biopsaten. Diese Theorie wird auch gestützt von den Ergebnissen in Tabelle 5, wo die IP10 Genexpression auch nur in den intraoperativen Biopsaten eine Signifikanz aufzeigt. Des Weiteren zeigt auch die gruppengetrennte Kinetik der Zielgenexpression der Patienten mit höchstens leichter versus derer mit mindestens mäßiger Abstoßung den größten Unterschied in der Genexpression von IP10, MIG, CXCR3 kurz nach Reperfusion mit dem Maximum der Genexpression zu diesem Zeitpunkt in der Gruppe mit den Patienten, die mindestens eine mäßiger Abstoßung 10-18 Tage nach Transplantation erlitten und dem Minimum zu diesem Zeitpunkt für die andere Gruppe.

## 4.2 Kritische Anmerkungen

Es gibt drei wichtige generelle Kritikpunkte, die bei Studien von Cytokin- beziehungsweise Chemokinexpression nach Organtransplantation bedacht werden müssen.

Erstens ist die Expression durch viele unterschiedliche Faktoren, wie Grunderkrankung, chirurgischer Stress, Ischämie-Reperfusionsschaden, Bluttransfusionen, verschiedene immunsuppressive Therapien etc. beeinflusst. Bei den meist kleinen Studienpopulationen ist es häufig nicht möglich, diesbezüglich eine homogene Studiengruppe zu bilden.

Zweitens wird die Expression in vielen Studien nur punktuell gemessen und vor allem interindividuell statt intraindividuell über einen definierten Zeitverlauf. Genau dies ist aber notwendig, wenn die Variation der Baseline vor Transplantation des einzelnen Patienten berücksichtigt werden soll.

Drittens werden aufgrund des einfacheren Probengewinns häufig im Blut zirkulierende Chemokine bzw. Cytokine gemessen, die aber nicht die Konzentration im entsprechenden Organ widerspiegeln müssen. Es gibt sogar Hinweise, dass hohe systemische Spiegel eine lokale T Zell Rekrutierung im entsprechenden Organ reduzieren (81).

In dieser Studie konnten die Punkte zwei und drei durch das Studiendesign umgangen werden, nicht jedoch der erste Punkt. Es sollten und können jedoch in dieser Studie keine pathophysiologischen Zusammenhänge gezeigt werden, deshalb ist die Frage der Studie lediglich, ob die Genexpression von IP10, MIG und CXCR3 prädiktiv für die Ergebnisse ist und steht somit nicht in Konflikt mit

dem oben genannten Aspekt. Die Studie soll zeigen, ob die Genexpression Chemokine IP10 und MIG sowie deren Rezeptor CXCR3 trotz ihrer vielfältigen Beeinflussbarkeit eine Aussage über den Verlauf nach Lebertransplantation vorhersagen können, ob also die Veränderlichkeit ihrer Expression durch Abstoßung signifikant deutlicher ist als Schwankungen durch diverse Faktoren.

Ein mögliches Unterschätzen des untersuchten Zusammenhangs könnte dadurch gegeben sein, dass aufgrund der geringen Patientenzahl und der daraus folgend fehlenden Normalverteilung die Statistik nur mit nicht parametrischen Tests erfolgen konnte, welche weniger kraftvoll als parametrische sind.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Studie konnte dargestellt werden, dass die RT-TaqMan PCR von Leberbiopsaten mittels Stanzbiopsien oder intraoperativ gewonnenen en bloc Proben eine zuverlässige und geeignete Methode zur Bestimmung der mRNA Expression von CXCR3, IP10 und MIG ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Chemokine IP10, MIG und deren Rezeptor CXCR3 während und nach oLTX in unterschiedlichem Maße exprimiert werden, dass sie aber insgesamt, unabhängig vom klinischen Verlauf, vor allem im frühen postoperativen Verlauf vermehrt exprimiert werden und damit schwache Marker für Abstoßungen sind.

Jedoch konnte gezeigt werden, dass die intraoperative Expression von IP10, MIG und CXCR3 einen signifikanten Zusammenhang mit dem Abstoßungsgeschehen im weiteren Verlauf hat. Es zeigt sich außerdem mit Zunahme der kalten Ischämiezeit ein signifikanter Anstieg der CXCR3 Expression kurz nach Reperfusion. Zusammenfassend deutet dies darauf hin, dass die Zielgene eine wichtige Rolle im Ischämie-Reperfusionsschaden spielen und dort ein therapeutischer Ansatz sinnvoller sein könnte, als im Bereich der immunsuppressiven Therapie.

Die auch schon während der Präparation des Transplantates nachgewiesenen und mit Abstoßungen im Zusammenhang stehenden Expressionen von IP10, MIG und CXCR3 lassen vermuten, dass diese sinnvolle Marker für die Organbeurteilung darstellen könnten.



Erwartungsgemäß fand sich kein Zusammenhang für Patienten- und Organüberleben sowie für die einzelnen Grunderkrankungen des Spenders oder des Empfängers.

Ob die Zielgene zum Immunmonitoring im Sinne einer „Weaningstrategie“ genutzt werden können, konnte diese Studie letztlich nicht beantworten. Dafür wären Studien mit mehreren Biopsien im Langzeitverlauf nach oLTX nötig.

## 6 Literaturverzeichnis

Nummer im Text, Autoren, Titel, Journal, Jahr der Veröffentlichung, Band, Seite

- 1 Cofer JB, Klintmalm GB, Howard TK, Morris CV, Husberg BS, Goldstein RM, Gonwa TA: A comparison of UW with Eurocollins preservation solution in liver transplantation, Transplantation, 1990, 49 (6), 1088-1093
- 2 Kalayoglu M, Sollinger WH, Stratta RJ, D' Alessandro AM, Hoffman RM, Pirsch JD, Belzer: Extended preservation of the liver for clinical transplantation, Lancet, 1988, 1, 617-619
- 3 Hatano E, Kiuchi T, Tanaka A, et al: Hepatic preservation with HTK solution in living-related and cadaveric liver transplantation, Clin Sci, 1997, 93, 81-88
- 4 Blumhardt G, Lemmens P, Topalidis T, Meissler M, Baer P, Steffen R, Schön M, Müller C, Neuhaus P.: Increased flow rate of preservation solution in the hepatic artery during organ preservation can improve postischemic liver function, Transplant Proc, 1993, 25, 2540-2542
- 5 Deutsche Gesellschaft für Organtransplantation, [www.dso.de](http://www.dso.de)
- 6 Schumacher G, Oidtmann M, Rosewicz, et al: Sirolimus inhibits growth of human hepatoma cells in contrast to tacrolimus which promotes cell growth, Transplant Proc, 2002, 34, 1392-1393
- 7 Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, et al: Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis involvement of vascular endothelial growth factor, Nat Med, 2002, 8, 128-135
- 8 Fasola CG, Netto GJ, Jennings LW, et al: Recurrence of hepatitis C in liver transplant recipients treated with MMF, Transplant Proc, 2002, 34, 1563-1564
- 9 Russel H, Wiesner, A, Jake Demetris, Steven H. Belle: Acute Hepatic Allograft Rejection: Incidence, Risk Factors, and Impact on Outcome, Hepatology, 1998, 28-3, 638-645
- 10 A.J. Demetris et al: Real Time Monitoring of acute Liver-Allograft Rejection using the Banff Schema, Transplantation, 2002, 74-9, 1290-1296
- 11 Schlitt HJ, et al: Intragraft immune events after human liver transplantation, Transplantation, 1992, 54-2, 273-278
- 12 Neuberger J, Adams DH: What is the significance of acute liver allograft rejection, Journal of Hepatology, 1998, 29, 143-150
- 13 Beaudreuil S, Samuel D, Rouas-Freiss N, Durrbach A: New aspect of immunosuppressive treatment in liver transplantation. How could you induce tolerance in liver transplantation?, Transplant Immunology, 2007, 17, 98-107
- 14 Mazariegos G. V. et al: Clinical tolerance following liver transplantation: Long term result and future prospects, Transplant Immunology, 2007, 17, 114-119
- 15 Bone-Larson C. L. , et al: Immunopathology of the liver, Immunological Reviews, 2000, 177, 8-20
- 16 Rosenkilde M. M. , Schwartz T. W.: The chemokine system- a major regulator of angiogenesis in health and disease, APMIS, 2004, 112, 481-95
- 17 Boncchi R, Bianchi G, Bordignon P P, et al: Differential Expression of Chemokine Receptors and Chemotactic Responsiveness of Type 1 T Helper cells and Th2 cells, J.Exp.Med, 1998, 187-1, 129-134

- 18 [Benseler V, et al](#): The Liver : A Special Case in Transplantation Tolerance, *Seminars in Liver Disease*, [2007](#), [27-2](#), [194-211](#)
- 19 [Loetscher M, et al](#): Chemokine Receptor Specific for IP10 and MIG: Structure, Function and Expression in Activated T-Lymphocytes, *J.Exp.Med*, [1996](#), [184](#), [963-969](#)
- 20 [Kim B M, Schultz L W, Raines R T](#): Variants of ribonuclease inhibitor that resist oxidation, *Protein Sci*, [1999](#), [8](#), [430-434](#)
- 21 [Pfaffl M W](#): Real Time PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung, *Biospektrum*, [2004](#), [1](#), [92-95](#)
- 22 [Ginzinger D G](#): Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream, *Experimental Hematology*, [2002](#), [30](#), [503-512](#)
- 23 [Baggiolini M](#): Chemokines and leukocyte traffic, *Nature*, [1998](#), [392](#), [565-568](#)
- 24 [Selmi C, et al](#): The Immunological Milieu of the Liver, *Seminars in Liver Disease*, [2007](#), [27-2](#), [129-139](#)
- 25 [Thomson CW, Lee BP, Zhang L](#): Double negative regulatory T cells, *Immunol Res*, [2006](#), [35](#), [163-178](#)
- 26 [Dustin LB, Rice CM](#): Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C, *Annu Rev Immunol*, [2007](#), [25](#), [71-99](#)
- 27 [Roland CR et al](#): Lymphocyte suppression by Kupfer cells, *Transplantation*, [1993](#), [55](#), [1151-1158](#)
- 28 [Roland CR et al](#): Outcome of Kupffer Cell antigen presentation to a cloned murine Th1 Lymphocyte, *J Immunol*, [1994](#), [153](#), [5453-5464](#)
- 29 [Marra F, Romanelli RG et al](#): Monocyte Chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells, *Hepatology*, [1999](#), [29](#), [140-148](#)
- 30 [Nakanuma Y et al](#): Histopathologie of primary biliary cirrhosis with emphasis on expression of adhesion molecules, *Semin Liver Dis*, [1997](#), [17](#), [35-47](#)
- 32 [Knolle PA et al](#): Induction of cytokine production in naive CD4+ cells by antigen presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th 1 cells, *Gastroenterology*, [1999](#), [116](#), [1428-1440](#)
- 31 [Haraldsen G et al](#): Major histocompatibility complex class II dependent antigen presentation by human intestinal endothelial cells, *Gastroenterology*, [1998](#), [114](#), [649-656](#)
- 33 [Limmer A et al](#): Efficient presentation of exogenous antigen specific T cell tolerance *Nat Med* [2000](#), [6](#), [1348-1354](#)
- 34 [Loetscher M, Loetscher P, Brass N et al](#): Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization, *Eur J Immunol*, [1998](#), [28](#), [3696-3705](#)
- 35 [Goddard S et al](#): Differential Expression of chemokines and chemokine receptors shapes the inflammatory response in rejecting human liver transplants, *Transplant*, [2001](#), [27\(12\)](#), [1957-1967](#)
- 36 [Bertolino P et al](#): Antigen specific primary activation of CD8+ T cells within the liver, *J Immunol*, [2001](#), [166](#), [5430-5438](#)
- 37 [Bowen DG et al](#): The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity, *J Clin Invest*, [2004](#), [114](#), [701-712](#)
- 39 [Sharland A et al](#): Evidence that apoptosis of activated T Cells occurs in spontaneous tolerance of liver allografts and is blocked by manipulation which break tolerance, *Transplantation*, [1999](#), [68](#), [1736-1745](#)
- 38 [Qian S et al](#): Apoptosis within the spontaneously accepted mouse liver allografts, *J Immunol*, [1997](#), [158](#), [4654-4661](#)

- 41 Klugewitz K et al: The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment?, *Trend Immunol* [2004](#), [25](#), [590-594](#)
- 40 Klugewitz K et al: Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4+ effector cells and suppression of INF  $\gamma$  producing cells after intravenous protein immunization, *J Immunol*, [2002](#), [169](#), [2407-2413](#)
- 42 Li W, Carper K, et al: Anti CD25 mAb administration prevents spontaneous liver transplant tolerance, *Transpl Proc*, [2006](#), [38](#), [3207-3208](#)
- 43 Li W, Carper K, et al: The role of FOXP3+ regulatory T cells in liver transplant tolerance, *Transpl Proc*, [2006](#), [38](#), [3205-3206](#)
- 44 Livak JK, Schmittgen D: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the delta,delta CT Method, *Methods*, [2001](#), [25](#), [402-408](#)
- 45 Krukemeyer M, Moeller J, et al: Description of Blymphocytes and Plasma Cells. Complement, and Chemokine/ Receptors in Acute Liver Allograft Rejection, *Transplantation*, [2004](#), [78](#), [65-70](#)
- 46 Goddard S, Youster J: Interleukin 10 secretion differentiates dendritic cells from human liver and skin, *Am J Pathol*, [2004](#), [164](#), [511-519](#)
- 48 Minguela A, et al: Implication of Th1, Th2 and Th3 Cytokines in Liver Graft Acceptance, *Transplantation Proceedings*, [1999](#), [31](#), [519-520](#)
- 47 Melter M: Chemokines and their receptors in human clinical solid organ transplantation, *Curr Opin Transplant*, [2002](#), [7](#), [77-84](#)
- 49 Moench C, et al: CC Chemokine Receptor 5delta Polymorphism - a Risk Factor for ITBL Following oLTX, *Liver Transplantation*, [2004](#), [10-3](#), [434-439](#)
- 50 Fischreder M, et al: CC Chemokine Receptor and renal- transplant survival, *Lancet*, [2001](#), [2](#), [1725-1726](#)
- 51 Wang T, Brown MJ: mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction, *Analytical Biochemistry*, [1999](#), [269](#), [198-201](#)
- 52 Henke W, et al: Detection of illegitimate transcripts of prostata-spezific antigen mRNA in blood by RT-PCR, *Cancer*, [1998](#), [77](#), [164-165](#)
- 53 Brooks EM, et al: Secondary Structure in the 3'UTR of EGF and the choice of reverse transcriptases affect the detection of mesage diversity by RT-PCR, *Biotechniques*, [1995](#), [19](#), [806-815](#)
- 54 Gerard GF, et al: The use of MMLV to synthesize cDNA from RNA, *Molecular Biotechnology*, [1997](#), [8](#), [61-77](#)
- 55 Zhang J, Byrne CD: Differential Priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy reproducibility of quantitative competitive RT-PCR, *Biochemical Journal*, [1999](#), [337](#), [231-241](#)
- 56 Grabko VI: Reverse transcription, amplification and sequencing of poliovirus RNA by TaqDNA polymerase, *FEBS Letters*, [1996](#), [387](#), [189-192](#)
- 57 Leutenegger CM, et al: Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, [1999](#), [71](#), [291-305](#)
- 58 Ito Y, et al: Oxidative Stress increase GAPDH mRNA levels in isolated rabbit aorta, *American Journal of Physiology*, [1996](#), [270](#), [H81-H87](#)

- 59 Zhong H, Simons JW: Direct comparison of GAPDH, beta actin, cyclophilin and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, [1999](#), [259](#), [523-526](#)
- 60 Ishitani R, et al: Overexpression of GAPDH is involved in low K induced apoptosis but not necrosis of cultured cerebellar granula cells, *Molecular Pharmacology*, [1997](#), [51](#), [542-550](#)
- 61 Chang TJ, et al: Up-regulation of beta actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma, *Oncology Reports*, [1998](#), [5](#), [469-471](#)
- 62 Winer J, Jung CK, et al: Development and validation of real time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro, *Analytical Biochemistry*, [1999](#), [270](#), [41-49](#)
- 63 Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *Journal of Molecular Endocrinology*, [2000](#), [25](#), [169-193](#)
- 64 Barber RD et al: GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues, *Physiol Genomics*, [2005](#), [21](#), [389-395](#)
- 65 Miura M et al: Monokine Induced by IFN- $\gamma$  Is a Dominant Factor Directing T Cells into Murine Cardiac Allografts During Acute Rejection, *The Journal of Immunology*, [2001](#), [167](#), [3494-3504](#)
- 66 Hancock W et al: Requirement of the Chemokine Receptor CXCR3 for Acute Allograft Rejection, *J Exp Med*, [2000](#), [190](#), [1515-1519](#)
- 67 Hancock W et al: Donor-derived IP10 Initiates Development of Acute Allograft Rejection, *J Exp Med*, [2001](#), [187](#), [975-980](#)
- 68 Segerer S et al: Expression of chemokines and chemokine receptor during human renal transplant rejection, *Am J Kidney Dis*, [2001](#), [37](#), [518-531](#)
- 69 Melter M et al: Expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand IP10 during human cardiac allograft rejection, *Circulation*, [2001](#), [104](#), [2558-2564](#)
- 70 Zhao DXM et al: Differential Expression of IP10, I-Tac and Mig in human cardiac allografts: association with cardiac allograft vasculopathy and acute rejection, *J Immunol*, [2002](#), [169](#), [1556-1560](#)
- 71 Fahmy NM et al: Chemokine and Chemokine receptor gene expression indicates acute rejection of human cardiac transplants, *Transplantation*, [2003](#), [75](#), [72-78](#)
- 72 Belperio JA et al: Critical role for CXCR3 chemokine biology in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome, *J Immunol*, [2002](#), [169](#), [1037-1049](#)
- 73 Kataoka M et al: Effect of cold-ischemia time on CXC chemokine expression and neutrophil accumulation in the graft liver after oLTX in rats, *Transplantation*, [2002](#), [73](#), [1730-1735](#)
- 74 Sung FL et al: Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF- $\kappa$ B, *Kidney Int*, [2002](#), [62](#), [1160-1170](#)
- 75 Hancock et al: Chemokines and their receptors as markers of allograft rejection and targets for immunosuppression, *Current Opinion in Immunology* [2003](#), [15](#), [479-486](#)
- 76 Yuan-Ji D et al: Protection from ischemic liver injury by activation of A2a adenosine receptors during reperfusion: inhibition of chemokine induction, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, [2004](#), [286](#), [G285-G293](#)

- 77 **Flach R**: Analysis of inragraft cytokine expression during early reperfusion after liver transplantation using semi-quantitative RT-PCR, *Cytokine*, [1998](#), *10*, [445-451](#)
- 78 **Howard TK et al**: The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient, *Transplantation*, [1990](#), *49*, [103-107](#)
- 79 **Yuan Zhai et al**: CXCR3+CD4+ T cells Mediate Innate Immune Function in the Pathophysiology of Liver Ischemia/Reperfusion Injury, *J Immunol*, [2006](#), *176*, [6313-6322](#)
- 81 **Rollins BJ**: Chemokines (Review), *Blood*, [1997](#), *90-3*, [909-928](#)
- 80 **Sabek O et al**: Quantitative detection of T-Cell Activation markers by real time PCR in renal transplant rejection and correlation with histopathologic evaluation, *Transplantation*, [2002](#), *5*, [701-707](#)
- 82 **Liao F et al**: Human Mig Chemokine: Biochemical and Functional Characterization, *J Exp Med*, [1995](#), *182*, [1301-1314](#)
- 83 **Baggiolini M**: Chemokines in Pathology and Medicine, *Journal of Internal Medicine*, [2001](#), *250*, [91-104](#)
- 84 **Loetscher P, Pellegrino a, Gong JH, Mattioli I, Loetscher M, Bardi G**: The Ligands of CXC chemokine receptor 3, I-Tac, MIG and IP10, are natural antagonists for CCR3, *J Biol Chem*, [2001](#), *276*, [2986-2991](#)
- 85 **Bone-Larson CL, Simpson KJ, Coletti LM, Lukacs NW, Chen SC, Lira S, Kunkel SL, Hogaboam CM**: The role of chemokins in the immunopathology of the liver, *Immunological Reviews*, [2000](#), *177*, [8-20](#)
- 86 **Coletti, LM, Green ME, Burdick MD, Strieter RM**: The ratio of ELR to Non-ELR CXC Chemokines affects the lung and liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat, *Hepatology*, [2000](#), *31*, [435-445](#)
- 88 **Ebert LM, Shaun RM**: Allogenic Activation, *The Journal of Immunology*, [2001](#), *166*, [4870-4878](#)
- 89 **Wiesner RH, Demetris J, Belle SH, Seaberg EC, Lake JR, Zettermann RK, Everhart J, Detre KM**: Acute Hepatic Allograft Rejection: Incidence, Risk Factors and Impact on Outcome, *Hepatology*, [1998](#), *28*, [638-645](#)
- 87 **Wall SJ, Edwards DR**: Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction: A Comparison of Primer-Dropping, Competitive, and Real-Time RT-PCRs, *Analytical Biochemistry*, [2002](#), *300*, [269-273](#)
- 91 **Strehlau J et al**: Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in Kidney transplantation, *Proc Natl Acad Sci USA*, [1997](#), *94*, [695-700](#)
- 90 **Conti F, Calmus Y, Rouer E, Gaulard P, Louvel A, Houssin D, Zafrani ES**: Increased expression of interleukin-4 during liver allograft rejection, *Journal of Hepatology*, [1999](#), *30*, [935-943](#)
- 92 **Grant S, et al**: Expression of cytokine messenger RNA after heart transplantation, *Transplantation*, [1996](#), *62*, [910-916](#)
- 94 **Moench C, Uhrig A, Lohse AW, Thies J, Otto G**: Differential Diagnosis of CMV Infection and Acute Rejection by Serum CC-Chemokine Measurement After oLTX, *Transplantation Proceedings*, [2003](#), *35*, [2084-2085](#)
- 93 **Bann C et al**: Kinetics of IL-2 and IL-4 mRNA and protein production by graft infiltrating lymphocytes responsible for rejection after clinical heart Transplantation, *Transpl Immunol*, [1997](#), *5*, [97-103](#)
- 95 **Nagpal ML, Chen Y, Lin T**: Effects of overexpression of CXCL10 on MA-10 mouse Leydig tumor cell steroidogenesis and proliferation, *Journal of Endocrinology*, [2004](#), *183*, [585-594](#)
- 96 **Yong Z, Chang L, Mei YX, Yi L**: Role and mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance, *Transplant Immunology*, [2007](#), *17*, [120-129](#)

- 97 Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, Ritchie SC, Hendrix R, Tucker-Burden C: Long term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways, *Nature*, 1996, 381, 434-438
- 98 Hubscher S: Diagnosis and grading of liver allograft rejection after liver transplantation, *Liver Transplant Surg*, 1995, 1, 10-15
- 99 Mele TS, Kneteman NM, Zhu LF et al: INF- $\gamma$  is an absolute requirement for spontaneous acceptance of liver allografts, *Am J Transplant*, 2003, 3, 942-951
- 100 Koopmans M, Kremer Hovinga ICL, Baelde HJ et al: Chimerism in kidneys, livers and hearts of normal woman: implications for transplantation studies, *Am J Transplant*, 2005, 5, 1495-1502
- 101 Wieers G, Gras J, Bourdeaux C, Truong DQ, Latinne D, Reding R: Monitoring tolerance after human liver transplantation, *Transplant Immunology*, 2007, 17, 83-93
- 102 Lang KS et al: Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling, *The Journal of clinical Investigation*, 2006, 116:9, 2456-2463
- 103 Thelen M: Dancing to the tune of chemokines, *Nat Immunol*, 2001, 2, 129-134
- 104 Hardstedt M, Collen P, Kirchhof N, Hyland KA, Wijkstrom M, Murtaugh MP, Hering BJ: Post-transplant upregulation of chemokine messenger RNA in non-human primate recipients of intraportal pig islet xenografts, *Xenotransplantation*, 2005, 12, 293-302
- 106 Akobeng AK: Understanding diagnostic tests 3: receiver operating characteristic curves, *Acta Paediatrica*, 2007, 96, 644-647
- 105 Gras J et al: Early Immunological Monitoring After Pediatric Liver Transplantation: Cytokine Immune Deviation and Graft Acceptance in 40 Recipients, *Liver Transplantation*, 2007, 13, 426-433

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

|               |   |
|---------------|---|
| Abb           | = Abbildung                                       |
| Abst          | = Abstoßung                                       |
| bzw.          | = beziehungsweise                                 |
| cDNS          | = komplementäre Desoxyribonukleinsäure            |
| CIT           | = kalte Ischämiezeit                              |
| CSA           | = Cyclosporin A                                   |
| Ct            | = Cycle Threshold                                 |
| DNS           | = Desoxyribonukleinsäure                          |
| GAPDH         | = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase        |
| GE            | = Genexpression                                   |
| HTK           | = Histidine-Tryptophan-Lösung                     |
| IL            | = Interleukin                                     |
| INF- $\gamma$ | = Interferon gamma                                |
| IP 10         | = Interferon gamma inducible Protein              |
| IRI           | = Ischämie-Reperfusionsschaden                    |
| JÜR           | = Jahres-Überlebens-Rate                          |
| KOF           | = Körperoberfläche                                |
| MHC           | = Major Histocompatibility Complex                |
| MHH           | = Medizinische Hochschule Hannover                |
| MIG           | = monokine induced by Interferon gamma            |
| MMF           | = Mycophenolat Mofetil                            |
| mRNS          | = messenger Ribonukleinsäure                      |
| MW            | = Mittelwert                                      |
| oLTX          | = orthotope Lebertransplantation                  |
| PCR           | = Polymerase-Chain-Reaction                       |
| RNS           | = Ribonukleinsäure                                |
| ROC Kurven    | = Receiver Operating Charakteristik Kurven        |
| RT-PCR        | = Reverse Transkriptase Polymerase-Chain-Reaction |
| SLECs         | = sinusoidale Endothelzellen                      |
| TNF alpha     | = Tumornekrosefaktor alpha                        |
| UW            | = University of Wisconsin Solution                |
| z.B.          | = zum Beispiel                                    |



## **7.2 Patienten-Information und Einwilligungserklärung zur Marker – Untersuchung (Chemokin-Studie):**

***Besteht eine Assoziation zwischen früh-postoperativer Gen-Expression von IP-10, Mig und/oder CXCR3 und der Entwicklung von Abstoßungen nach Leber- oder Nierentransplantation, und ist diese organspezifisch different?***

Sehr geehrte Patientin,

sehr geehrter Patient,

im Rahmen der bei Ihnen geplanten Lebertransplantation wurden Sie gefragt, ob Sie an einer Untersuchung teilnehmen wollen, zu der die Entnahme einiger, weniger Gewebeproben aus Ihrem Transplantatorgan erforderlich ist. Hierbei ist geplant zunächst eine Probe aus Ihrem Transplantatorgan zu entnehmen, bevor es bei Ihnen eingepflanzt wird und eine 2. Probe kurz nachdem es wieder durchblutet („nach Reperfusion“) ist. Selbstverständlich spüren Sie von diesen Probeentnahmen nichts, weil sie in Narkose liegen und auch, weil die Transplantatleber für Sie schmerzfrei ist. Eine weitere Probe soll dann zwischen Tag 10 und Tag 18 nach der Transplantation auf der Station entnommen werden. Diese Probenentnahme erfolgt mittels einer Feinnadel (weniger als halb so dick wie eine Blutentnahmenadel) und ist daher sehr risiko- und schmerzarm durchzuführen. Unabhängig von dieser Studie, wird bei jedem Verdacht auf eine Abstoßungsreaktion routinemäßig eine Probeentnahme aus Ihrem Transplantatorgan durchgeführt. Nehmen Sie an dieser Studie teil, wird auch ein kleines Stück dieser Probe für diese Studie genutzt.

Bevor Sie sich entscheiden, sollten Sie diese Patienten-Information ausführlich lesen und eventuell verbleibende Fragen mit Ihrem Arzt / Ihrer Ärztin besprechen, der/die Ihnen selbstverständlich für weitere Informationen gerne zur Verfügung steht.

Ihre Teilnahme an dieser Untersuchung ist völlig freiwillig. Es entstehen Ihnen keine Nachteile, wenn Sie nicht daran teilnehmen wollen. Außerdem können Sie Ihre Zustimmung jederzeit und ohne Angabe von Gründen widerrufen, ohne dass Ihnen hieraus Nachteile für Ihre weitere Behandlung entstehen.

### **Was ist eine Marker-Untersuchung ?**

Bestimmte Anteile im Erbmaterial, den so genannten Genen, sind nur zu bestimmten Zeiten nachweisbar, bzw. erhöht nachweisbar, zum Beispiel wenn der Körper versucht Fremdkörper (wie z.B. Ihr Transplantatorgan) zu vernichten (Abstoßung). Es wird vermutet, dass einige solcher Gene schon gefunden werden können, bevor es zu einer Abstoßung kommt. Wir nennen solche Gene, oder auch die aus ihnen entstehenden Eiweiße, *Marker*. Heute kennt man noch keine solchen *Marker*, die eine Abstoßung sicher vorhersagen lassen. Wenn es gelänge frühzeitig zu erkennen, dass der Körper versucht das Transplantat abzustößen, könnte eine Vorbeugung einer solchen Abstoßung frühzeitig begonnen werden, und eventuell könnten dann Abstoßungen verhindert werden. Wir haben in wissenschaftlichen Untersuchungen gefunden, dass einige der Gene, die in dieser Studie als *Marker* untersucht werden sollen, bei herztransplantierten Patienten geeignet waren als *Marker* Abstoßungen anzukündigen.

Diese Ergebnisse machen es wahrscheinlich, dass diese Gene auch gute *Marker* für die Entstehung einer Abstoßung bei Nieren- und Lebertransplantierten sind. Die für diese Studie erforderlichen Laboruntersuchungen der DNS, die aus einer Probe aus Ihrem Transplantatorgan gewonnen wird, dient ausschließlich zur Bestimmung derjenigen Gene (siehe oben), die im Rahmen dieser Studie untersucht werden.

#### **Was sind die Risiken dieser Untersuchung ?**

Das Risiko von Feinnadelbiopsien, wie z.B. ein Bluterguss, ist nur extrem gering, weil hierzu eine sehr dünne Nadel (circa halb so dick wie eine Blutentnahmenadel) verwandt wird, und weil Ihr Transplantatorgan leicht zugänglich und mit seiner Umgebung verklebt ist. Darüber hinaus ist die Probeentnahme aus Ihrem Transplantatorgan fast schmerzfrei, da Sie keine Schmerzen in Ihrem Transplantatorgan empfinden können. Es kommt also lediglich bei dem Stich (sehr dünne Nadel!!) durch die Haut zu einem geringen Schmerz.

#### **Was sind die Vorteile der Teilnahme an dieser Untersuchung ?**

Persönlich werden Sie vermutlich keinen direkten Vorteil oder Nutzen aus dieser Untersuchung haben. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind für Forschungs-zwecke bestimmt und werden keine Konsequenzen für Ihre Behandlung haben. Die gewonnenen wissenschaftlichen Erkenntnisse können jedoch dazu beitragen, zukünftig individuell für jeden Patienten sicherer und eventuell früher Hinweise auf die Entstehung einer Abstoßung zu erhalten. Nur mittels solcher *Marker* wird es gelingen eine Abstoßung früher und wirksamer behandeln, oder eventuell verhindern zu können. Darüber hinaus können solche *Marker* eventuell auch genutzt werden, zu erkennen wie viel oder wie lange der einzelne Patient abstoßungsverhindernde Medikamente erhalten muss. Damit könnte es sogar möglich sein, dass Sie selbst in einigen Jahren von diesen *Marken* profitieren können.

#### **Gewinnung, Untersuchung und Lagerung des genetischen Materials**

Die Probe aus Ihrem Transplantatorgan, bzw. die daraus gewonnene DNS wird für zukünftige Forschungen bis zu 20 Jahre aufbewahrt. Während dieser gesamten Zeit bleiben Sie Eigentümer der Probe und haben jederzeit das Recht, Ihre Zustimmung zu widerrufen und die Vernichtung der Probe zu verlangen. In diesem Falle wenden Sie sich bitte an den zuständigen Studienarzt.

Die Medizinische Hochschule Hannover, bzw. die diese Untersuchung durchführenden Wissenschaftler werden Eigentümer der daraus gewonnenen Daten und Entdeckungen und sind verantwortlich für die Vernichtung der Probe auf Ihr Verlangen.

#### **Vertraulichkeit**

Die Ergebnisse dieser Untersuchung dienen ausschließlich Forschungszwecken und werden deshalb keinem Dritten zur Verfügung gestellt. Alle Informationen und Ergebnisse, die mit der Untersuchung Ihres genetischen Materials (DNS) in Verbindung stehen, werden den gesetzlichen Vorschriften entsprechend absolut vertraulich behandelt.

#### **Kosten**

Die Teilnahme an dieser Untersuchung ist für Sie und Ihre Krankenkasse mit keinen Kosten verbunden.

**Weitere Informationen**

Sollten Sie noch weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an Ihren für die klinische Prüfung zuständige/n Arzt/Ärztin. Stellen Sie alle Fragen, die Ihnen wichtig erscheinen und lassen Sie sich ausreichend Zeit für Ihre Entscheidung zur Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Untersuchung.

Falls Sie sich für die Teilnahme entscheiden, werden Sie gebeten, Ihre Einwilligung hierzu schriftlich zu erteilen.

**Einwilligungserklärung**

Hiermit erkläre ich meine Einwilligung zur Teilnahme an der *Marker*-Untersuchung. Durch meine Unterschrift bestätige ich, dass ich den Inhalt dieser Patienten-Information zur *Marker*-Untersuchung gelesen und verstanden habe. Ich hatte Gelegenheit Fragen zu stellen, die mir zufriedenstellend beantwortet wurden. Ich weiß, dass ich meine Einwilligung jederzeit und ohne Angabe von Gründen widerrufen und auch zu einem späteren Zeitpunkt die Vernichtung meiner Probe fordern kann, ohne dass mir daraus irgendwelche Nachteile entstehen.

Eine Kopie dieser Patienten-Information und Einwilligungserklärung habe ich erhalten.

Unterschriften:

---

Datum

---

Patient/in

---

Datum

---

Prüfarzt/ärztin

### 7.3 Lebenslauf

Name: Norman Junge

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Geburtsdatum: 14.08.1979

Geburtsort: Hoyerswerda

wohnhaft in: 30163 Hannover, Podbielskistrasse 29

#### ASSISTENZARZT

Seit 01. Februar 2009 in der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung für pädiatrische Gastroenterologie und Hepatologie

15. Juni 2007 bis 31. Januar 2009 im Universitätsklinikum Göttingen, Abteilung für pädiatrische Kardiologie, Intensivmedizin und Neonatologie

#### STUDIUM

Oktober 2000- Juni 2007 Medizinische Hochschule Hannover

Juni 2007 Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung „gut“ (1,99)

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „gut“ (2,0)

September 2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „gut“ (1,66)

August 2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „befriedigend“

September 2002 Ärztliche Vorprüfung, Note „gut“ (1,66)

#### PRAKTISCHES JAHR

Mai 2006-April 2007 Chirurgie an der University of West Indies in Port of Spain, Trinidad

Pädiatrie im Zentrum für Kinderheilkunde der Medizinischen Hochschule Hannover

Innere Medizin am Agnes-Karll-Krankenhaus der Region Hannover

#### SCHULABSCHLUSS

Juni 1999 Abschluss der Schulausbildung mit Hochschulreife an der Carl-Friedrich-Gauß Schule nach 13 Schuljahren.

## 7.4 Erklärung über Selbständigkeit

„ Ich , Norman Junge, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt"

Datum

Unterschrift

## **7.5 Erklärung zur Anregung und Überwachung der Dissertation**

„Ich, Norman Junge, erkläre hiermit, dass Herr Professor Dr. med. M. Melter die vorliegende Dissertation angeregt und überwacht hat.“

Datum

Unterschrift

## 8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik für pädiatrische Nieren-, Leber- und Stoffwechselerkrankungen (Direktor: Herr Professor Dr. med. J.H.H. Ehrich) des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Medizinische Hochschule Hannover in Zusammenarbeit mit der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie (Direktor: Herr Professor Dr. med. J. Klemphauer) des Zentrums Chirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Betreuung von Prof. Dr. med. M. Melter (ehemals Oberarzt und Arbeitsgruppenleiter der pädiatrischen Gastroenterologie und Hepatologie der MHH) erstellt.

Ich danke der Klinik von Herrn Professor Dr. med. J.H.H. Ehrich sehr herzlich für die Möglichkeit zur Durchführung der Dissertation.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. M. Melter für die Ermöglichung dieser Arbeit und die sehr gute Betreuung sowie Unterstützung seinerseits, auch nach seinem Wechsel an die Universität Regensburg.

Für die großartige Unterstützung im Labor möchte ich Margit Überheide ganz besonders danken.

Ich möchte mich auch bei J. Vermehren für die Hilfe und Beantwortung bei PCR Problemen und Fragen ganz herzlich bedanken.

Ich danke den Mitarbeitern der Klinik von Herrn Professor Dr. med. J. Klempnauer sehr herzlich für die sehr kooperative Zusammenarbeit an dieser Studie.

Im Besonderen möchte ich mich hier für die sehr gute Unterstützung zur Durchführung dieser Arbeit bei Herrn PD. Dr. med. T. Becker und Herrn B. Ringe bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei Herrn Professor Dr. med. M. Neipp und Herrn Dr. med. A. Meyer zu Vilsendorf.

Ich bedanke mich bei dem Universitätsklinikum Regensburg für die unkomplizierte Möglichkeit zur Durchführung meines Promotions- Verfahrens unter Prof. Dr. med. M. Melter nach dessen Berufung zum Direktor der Klinik für Kinder und Jugendmedizin der Universitätsklinik Regensburg.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich in meinem Lebensweg bis hierher und bei dieser Arbeit stets großartig unterstützt und motiviert haben, sowie bei meiner Frau für die tolle Unterstützung, Motivation und endloses Verständnis.